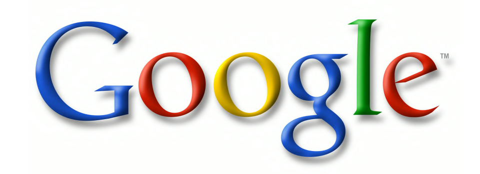
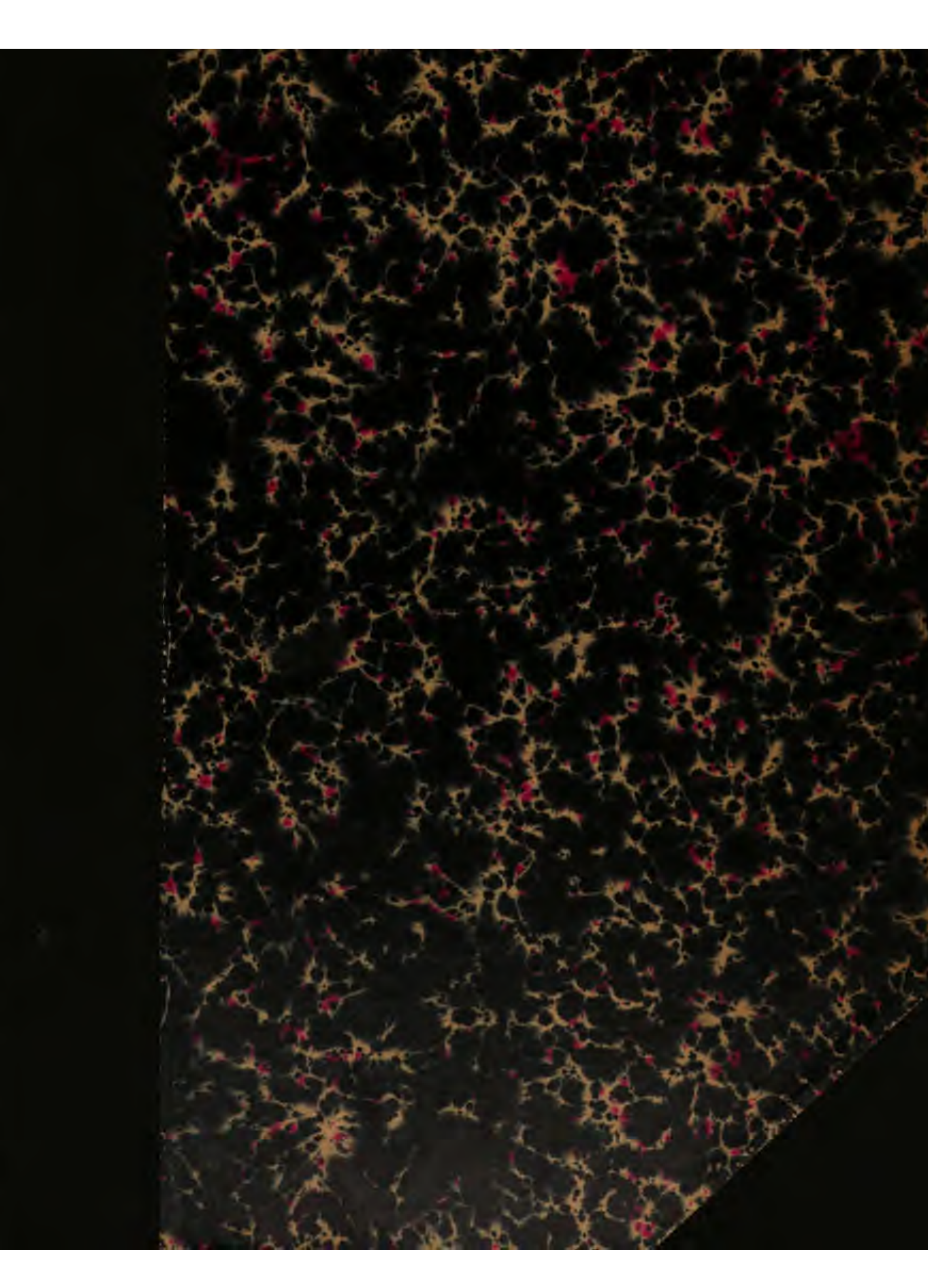




Série A N° 420
N° d'ordre
1099

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. Alexandre GUILLIERMOND

1re THÈSE. — Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures a formes levures.

2e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 9 juin 1902 devant la Commission d'examen

MM. Gaston BONNIER . . . *Président*
DASTRE . . . . . . } *Examinateurs*
HAUG . . . . }

A. STORCK & Cie, IMPRIMEURS-ÉDITEURS
— LYON —
PARIS, 16, Rue de Condé, près l'Odéon
—
1902

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

	MM.	
Doyen	Gaston DARBOUX, *Professeur*, Géométrie supérieure.	
Professeur honoraire	Louis TROOST.	
Professeurs	LIPPMANN	Physique.
	HAUTEFEUILLE	Minéralogie.
	BOUTY	Physique.
	APPELL	Mécanique rationnelle.
	DUCLAUX	Chimie biologique.
	BOUSSINESQ	Physique mathématique et Calcul des probabilités.
	PICARD	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
	H. POINCARÉ	Astronomie mathématique et Mécanique céleste.
	Yves DELAGE	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparée.
	Gaston BONNIER	Botanique.
	DASTRE	Physiologie.
	DITTE	Chimie.
	MUNIER-CHALMAS	Géologie.
	GIARD	Zoologie. Évolution des êtres organisés.
	WOLF	Astronomie physique.
	KŒNIGS	Mécanique physique et expérimentale.
	VÉLAIN	Géographie physique.
	GOURSAT	Calcul différentiel et Calcul intégral.
	CHATIN	Histologie.
	PELLAT	Physique.
	HALLER	Chimie organique.
	H. MOISSAN	Chimie.
	JOANNIS	Chimie (Enseignem. P. C. N.)
	P. JANET	Physique —
	N.	Zoologie, Anatomie, Physiologie comparée.
Professeurs adjoints	PUISEUX	Mécanique et Astronomie.
	RIBAN	Chimie analytique.
	RAFFY	Analyse et Mécanique.
	LEDUC	Physique.
	HAUG	Géologie.
	HADAMARD	Calcul différentiel et Calcul intégral.
	ANDOYER	Astronomie mathématique et Mécanique céleste.
Secrétaire	FOUSSEREAU.	

PRÉFACE

Les perfectionnements de la technique histologique ont permis depuis quelques années d'aborder les problèmes ardus de la structure des « infiniment petits ». Les résultats obtenus chez un certain nombre de protozoaires et d'algues paraissent aujourd'hui définitivement établis et ont démontré chez ces organismes élémentaires la présence toujours constante d'un noyau. Il n'y aurait guère que les Monères de Hœckel qui, d'après cet auteur, feraient exception à la règle. Mais Grüber grâce à des méthodes nouvelles de coloration est arrivé à déceler dans un grand nombre de Monères la présence de granules présentant les caractères

de la substance nucléaire et il y a une tendance à ne plus admettre l'existence de Protistes non nucléés.

D'autre part l'ensemble des recherches cytologiques faites sur les animaux, sur les végétaux et certaines expériences de Balbiani et Klebs ont montré le noyau comme un organe indispensable à la vie cellulaire.

Cependant chez les Bactériacées, les Cyanophycées et les levures, si un grand nombre de mémoires ont été publiés sur ce sujet depuis une vingtaine d'années, la question du noyau n'en reste pas moins d'une inextricable confusion.

Malgré la difficulté de cette étude, nous avons essayé d'apporter quelques observations nouvelles sur la structure des levures, en nous appuyant surtout sur les données récemment introduites par un important travail de Wager.

Notre but a été simplement de différencier le noyau des divers éléments de la cellule et d'étudier son rôle biologique, en faisant abstraction de tout ce qui regarde la membrane. Afin d'apporter quelque précision et d'éviter

les chances d'erreur, nous avons suivi une méthode toute différente de celle de nos devanciers ; elle a consisté à comparer la structure de certaines moisissures, que leurs dimensions rendaient plus faciles à étudier, à celle des levures et enfin à employer comparativement un très grand nombre de méthodes de fixation et de coloration.

Ce travail a été fait au laboratoire de botanique de l'Université de Lyon. Nous sommes heureux de remercier ici M. le professeur Gérard de l'aimable accueil qu'il nous fait dans son laboratoire et de l'intérêt qu'il a toujours porté à nos recherches; nous adressons toute notre gratitude à M. Ray, maître de conférences à la Faculté, qui nous a guidé dans nos premiers pas et nous a initié aux travaux de laboratoire.

Nous tenons à exprimer notre plus vive reconnaissance à M. Matruchot, maître de conférences à l'École normale supérieure qui a bien voulu examiner nos préparations et nous aider de sa grande expérience dans leur interprétation si délicate.

Nous soumettons ce travail à la bienveillance de notre président de thèse, M. le professeur Gaston Bonnier. Nous n'aurions pas entrepris cette étude, si nous ne nous étions, dès le début, senti soutenu par la bienveillance d'un maître toujours prêt à encourager les recherches de botanique.

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION

I. — Historique de la question

Depuis longtemps les botanistes se sont préoccupés de la structure des champignons. De nombreux observateurs, tels que Schmitz, Strasburger, Dangeard, Istwanfi, démontrèrent l'existence du noyau dans la plupart des moisissures, et ces résultats furent confirmés d'une manière définitive par de plus récentes études. Seule, la question du noyau des levures devait rester controversée ; la petite dimension de leurs cellules, la forte affinité du cytoplasme pour les matières colorantes, jointes à la présence d'un très grand nombre de produits divers disséminés dans la cellule et capables de

fixer les colorants, rendaient extrêmement difficile la différenciation du noyau. Aussi depuis très longtemps les observations se suivent sans apporter autre chose que dès résultats contradictoires.

Schleiden (1845) et Naegeli (1846) aperçurent pour la première fois le noyau des levures. Longtemps après, Schmitz (1879), à l'aide d'une fixation à l'acide picrique et d'une coloration à l'hématéate d'ammoniaque, trouve à son tour dans le *S. cerevisiæ* et le *S. mycoderma vini*, des corps qu'il considère comme des noyaux. D'après lui, il y aurait dans chaque cellule un noyau sphérique logé dans le plasme et à peu près au centre de la cellule.

Zalewsky (1885) étudie la sporulation du *S. ellipsoïdeus*. Il place quelques cellules de cette levure sur des gouttelettes pendantes d'eau distillée et suit le processus de la formation des spores. Il contaste que la cellule devient vacuolaire, puis les vacuoles finissent par se fusionner pour constituer une seule grosse vacuole occupant presque toute la cellule et rejetant le protoplasme à la périphérie. Certaines parties de ce protoplasme forment des saillies, se gonflent et constituent les spores. On distingue dans ce plasme sporogène quelques granules que l'auteur considère comme des noyaux en voie de division. D'autre part, en colorant la

levure avec l'hématoxyline, il arrive à mettre en évidence dans chaque cellule à l'état de repos, un noyau unique constitué d'une masse ellipsoïdale avec un petit nucléole.

Hansen (1886) constate dans le *S. pastorianus* un corps analogue à celui qu'avait décrit Schmitz, et qui serait également pour lui le noyau. A peu près à la même époque Strasburger (1886) colore le *S. cerevisiæ* au moyen de l'hématéate d'ammoniaque après fixation à l'acide picrique et voit dans chaque cellule, vers le centre, un petit noyau arrondi de couleur sombre. Zacharias (1887) décèle également à l'aide de l'hématoxyline un corps qui correspondrait au noyau et qui lui semble posséder les caractères microchimiques de la nucléine. Zimmermann (1887) se range aussi à cette opinion dans son Traité sur la morphologie et la physiologie du noyau des végétaux.

Kunstler et Busquet (1890) publient une étude histologique sur le *S. guttulatus*. Ils observent une structure protoplasmique très compliquée dans laquelle ils distinguent : 1° une couche sous-cuticulaire hyaline (ectoplasme) à organisation fibrillaire ; 2° une couche moyenne formée d'alvéoles et dont chaque alvéole contient une subtance capable de se colorer intensivement : 3° deux vacuoles centrales occupant la majeure partie de la cellule. Ils différencient de même un

noyau, situé au centre de la cellule et constitué d'une masse chromatique entourée d'une zone hyaline. L'ensemble de ce noyau montre une structure alvéolaire. L'existence du noyau serait selon eux indubitable.

D'autre part les analyses de Hoppe Seyler et de Kossel (1882), mettant en évidence la présence de la nucléine dans les levures, venaient à l'appui de ces différentes observations.

Cependant Brücke (1861) et Krasser (1881), les premiers, avaient nié l'existence du noyau dans les cellules des levures. Roux et Linossier (1890), étudiant le champignon du muguet, ne parvenaient pas non plus à différencier le noyau à l'aide des couleurs d'aniline et pensaient que la nucléine était diffuse dans le protoplasme comme chez les bactéries.

De son côté, Raum (1891) ne put réussir à démontrer la présence du noyau. Il étudie un grand nombre de levures (*S. pastorianus*, *S. ellipsoïdeus, Monilia candida, S. Kefir*, divers *Torula)*. Il fixe par la chaleur et emploie comme colorant un mélange de bleu de méthylène et de brun de Bismarck, suivant la méthode utilisée par Ernst pour les bactéries. Il arrive par ce procédé à différencier des granules noirs se détachant sur un fond jaune ou brun; ces granules sont très variables d'une cellule à l'autre, aussi bien par leur

dimension que par leur nombre. Ce ne sont pas des formations absolument constantes ; ils sont surtout nets lorsque les cellules sont en pleine vitalité ; ils sont quelquefois disséminés de côté et d'autre dans le protoplasme, mais le plus souvent ils forment une masse à contour irrégulier et qui pourrait être assimilée à un noyau. Ces granules semblent être très plastiques et pénètrent dans les bourgeons en se rétrécissant dans le col qui unit le jeune bourgeon à la cellule mère. Raum les a constatés toujours à proximité des vacuoles, avec lesquelles ils sont dans un rapport constant. Les vacuoles seraient, suivant cet auteur, capables à certains stades de fixer la couleur et de se transformer en ces granules. Au moment de la sporulation, les granules se multiplient et forment un cercle autour de la cellule, puis se fusionnent pour entrer dans la constitution des spores comme les grains sporogènes de Ernst. Ils correspondraient aux vacuoles décrites par Zalewski au moment de la sporulation. Ces granules ne sont pas constants dans la cellule, n'offrent aucune trace de structure et n'ont pas les propriétés microchimiques de la nucléine ; aussi Raum se refuse-t-il à les considérer comme des noyaux et les rapproche des *grains sporogènes* découverts par Ernst chez certaines bactéries.

Moeller (1892) affirme au contraire la présence d'un noyau dans le *S. Cerevisiæ*. Il fixe les cellules par une solution d'iodure de potassium saturée d'iode et colore au moyen de la fuchsine, de l'hématéine ou du violet de gentiane. Il obtient ainsi la différenciation d'un noyau. Ce noyau est homogène et possède une forme variable, le plus souvent ronde, mais quelquefois discoïdale ou lobée. Il est situé soit au milieu de la cellule, soit au voisinage de la membrane. Il semble être doué de mouvements amiboïdes. Sa division paraît s'effectuer suivant le mode direct. Le protoplasme contient en outre une grande quantité de microsomes qui se teignent intensivement par le bleu de méthylène. L'auteur cherche à étudier le rôle du noyau dans la formation des spores, mais il ne parvient pas à observer sa division. Le noyau reste à l'état de repos dans le plasme de la cellule, alors même que les spores naissent à côté, sous forme de petites masses arrondies, qui se colorent uniformément sans qu'on y puisse distinguer de noyau. En présence de pareilles singularités, Moeller n'hésite pas à nier l'existence des spores chez les levures et à prendre les corps ainsi décrits pour de simples gouttelettes de graisse exsudées du protoplasme en dégénérescence et dépourvues de membranes et de noyaux. Moeller étudie

dans le même travail quelques conidies levures d'Ustilaginées et constate une complète similitude entre la structure de ces formes levures et les véritables levures ; il s'en sert pour nier l'indépendance du genre *Saccharomyces*.

En 1893, Mœller reprend ses recherches et confirme sa manière de voir au sujet du noyau en employant cette fois l'hématoxyline de Heidenhain, mais il reconnaît son erreur à l'égard des spores. Il constate chez les *Saccharomyces* de véritables spores endogènes contenant chacune un noyau et provenant de la division amitotique du noyau de la cellule mère.

Krasser (1893), se basant sur ce que les corps de Mœller ne possèdent pas les propriétés de la nucléine, réfute ce travail et considère le protoplasme des levures comme un archiplasme dans lequel serait disséminée la nucléine.

Hiéronymus (1893) arrive de son côté à des résultats tout à fait différents de tous ceux que nous venons d'analyser. A l'aide d'une solution de carmin acétique, il observe une structure particulière dans le *S. cerevisiæ:* la cellule serait traversée de part en part par un filament central (*centralfaden*) enroulé en spirale ou pelotonné et formé d'un grand nombre de granules réunis par du protoplasme et fortement colorables. Ces granules auraient des formes

très irrégulières, la plupart seraient anguleuses et dans les plus gros l'auteur croit reconnaître des contours géométriques et les considère comme des cristalloïdes. Quelques-uns de ces granules se répandraient dans les vacuoles et y seraient animés de mouvements browniens. Ceux-ci, très gros, montreraient nettement des formes tétraédriques. Hiéronymus compare cette structure à celle qu'il avait observée chez les Phycochromacées, où il existerait le même centralfaden. Les réactions microchimiques de ces granules lui donnent des résultats incertains, mais il croit néanmoins pouvoir les assimiler à des grains de chromatine et l'ensemble constituerait l'équivalent d'un noyau.

L'étude du noyau des levures fut reprise en 1893 par M. Dangeard ; par une fixation à l'alcool absolu et une coloration à l'hématoxyline, il met en évidence dans le *S. cerevisiæ* un noyau formé d'un nucléole incolore et d'une vésicule limitée par une membrane. La division paraît s'accomplir par voie amitotique. Certaines figures lui rappellent les dessins d'Hieronymus et le centralfaden et il se les explique par une fixation défectueuse qui aurait déchiré le noyau et l'aurait divisé en fragments. De son côté Janssens (1893) est amené à constater aussi l'existence d'un noyau dans plusieurs levures.

B. Fischer et Brebeck (1894) signalent chez

quelques levures la présence d'un noyau analogue à celui qu'avait décrit Moeller.

Beyerinck (1894), dans sa Monographie du *Schizosaccharomyces octosporus* découvert par lui sur des raisins de Turquie, observe pendant la sporulation des corps réfringents paraissant se diviser avant la formation des spores et qui seraient des noyaux.

Dans ses leçons sur la cellule, Henneguy (1896) admet également l'existence d'un noyau et il s'appuie pour cela sur des observations qu'il a faites sur une levure rose développée accidentellement sur une culture de pus blennorhagique et chez laquelle il observait un noyau entouré d'une membrane d'enveloppe et contenant un nucléole.

Crato (1896) remarque dans certaines levures une structure alvéolaire très voisine de celles qu'il avait rencontrées dans les algues et aperçoit un corps sphérique qu'il croit être un noyau.

Dans ces dernières années, on découvrit certaines levures pathogènes qui furent l'objet d'un grand nombre de travaux histologiques. Maffuci et Sirleo (1895) isolent une levure d'un néoplasme du poumon de cobaye. Ils observent cette levure avec une coloration à l'hématoxyline et trouvent un noyau logé au centre de la cellule, qui occupe la majeure partie de la

cellule ; il est formé d'une vésicule limitée par une membrane et contient à son intérieur un certain nombre de granules qui représentent de la chromatine. Au moment du bourgeonnement, il s'étire et pénètre dans les jeunes bourgeons en se divisant par amitose.

Mais bientôt après, Roncali (1895), étudiant quelques levures pathogènes trouvées dans différents tissus et s'appuyant sur les recherches de Sanfelice, conteste les résultats de Maffuci et Sirleo, et décrit chez les levures un protoplasme formé de deux substances, dont l'une périphérique se colore fortement et l'autre centrale se teint moins intensivement et a dans les préparations fraîches un aspect hyalin. On trouve disséminés dans la partie hyaline de ce protoplasme des granules réfringents qui fixent les matières colorantes et auxquels on doit attribuer la valeur de grains de nucléine. La nucléine serait donc mélangée au protoplasme comme chez les bactéries. Ces résultats sont obtenus à l'aide du carmin de lithium.

Eisenschitz (1895) retrouve dans le protoplasme des levures des granulations analogues à celles de Raum. Il colore ces préparations par le vert de méthyle et le rouge de Congo. Il décrit dans la cellule deux catégories de granules qui fixent énergiquement les matières colorantes ; les uns se trouvent dans le protoplasme, les

autres sont situés dans la vacuole et ordinairement dans la périphérie. Ces granules se distinguent par leur réaction chimique; les premiers résistent à l'action d'une solution concentrée d'acide chlorhydrique; au contraire ceux qui sont contenus dans les vacuoles se dissolvent comme la nucléine et cette propriété, jointe à l'absence du noyau et à leur affinité pour les matières colorantes, fait admettre à l'auteur qu'ils sont de nature nucléique. Le noyau de ces êtres élémentaires serait donc réduit à l'état d'une simple vacuole contenant un certain nombre d'éléments solides qui représenteraient des grains de chromatine. L'hypothèse de l'origine vacuolaire du noyau avait déjà été formulée par quelques histologistes et, entre autres, Hofmeister et Auerbach; Eisenschitz se croit autorisé à considérer cette vacuole comme un stade primitif de l'évolution du noyau, qui serait complété dans le développement phylogénétique pour en arriver à la conformation du noyau des organismes supérieurs. Nous verrons plus loin que cette théorie sera reprise par Wager.

Curtis (1895) découvre dans certaines tumeurs malignes une levure qu'il désigne sous le nom de *S. tumefaciens*. Sous l'inspiration de Metschnikoff, il étudie la structure de cette levure. Il colore avec le vert de méthyle,

réactif spécifique de la nucléine, et n'arrive dans aucun cas à démontrer la présence d'un noyau, mais il observe dans le protoplasme des granules réfringents : les uns ne se colorent pas et seraient des matières de réserve de nature albuminoïde, les autres fixent le vert de méthyle et peuvent être assimilés à des grains de chromatine. En effet, ces granules disparaissent sous l'action des dissolvants de la nucléine et après ce traitement le protoplasme prend une couleur foncée paraissant due à une diffusion de la nucléine.

Macallum (1896), par des procédés d'un autre ordre, arrive à de semblables résultats. Ayant démontré, dans des recherches antérieures, la présence du fer dans le noyau des animaux et des végétaux, il essaie de différencier le noyau en mettant en évidence ce métal à l'aide de certains réactifs chimiques et il compare les résultats obtenus par cette méthode avec ceux que lui donnent les matières colorantes (hématoxyline, safranine, éosine) ; il observe un grand nombre d'organismes et notamment des champignons et des algues. Par des colorations à l'hématoxyline, après fixation par la liqueur de Flemming, il remarque chez le *S. cerevisiæ* un petit corps présent dans chaque levure et correspondant au noyau décrit antérieurement, mais ce corps ne se colore pas par la safranine

et ne se différencie pas avec l'hématoxyline, lorsqu'on a employé la fixation au sublimé; l'auteur met en doute sa nature de nucléine. Le *S. Ludwigii* possède de semblables corps, qui se manifestent encore plus nettement. Le reste du protoplasme se colore fortement et montre une structure alvéolaire dont les nœuds des mailles contiennent des granulations plus colorables qui ressemblent par certains côtés aux granules de Raum. Souvent il existe, au lieu de petits alvéoles, de grosses vacuoles occupant le centre de la cellule. En traitant la cellule par le sulfhydrate d'ammoniaque, on obtient une coloration verte diffuse du protoplasme qui indique la présence du fer disséminé dans tout le protoplasme et qui correspond avec la propriété de ce protoplasme de fixer l'hématoxyline. Mais les granules situés dans les nœuds du protoplasme apparaissent en vert foncé montrant une condensation de la nucléine et, lorsqu'il existe de grands alvéoles, cette coloration intense se manifeste sur leur périphérie. Enfin il existe une masse fortement colorée en vert qui représente les noyaux des auteurs précédents. Macallum ne croit pas pouvoir les considérer comme tels, étant donnée l'irrégularité de leur coloration avec les colorants nucléaires, et il ignore leur signification. La nucléine des levures serait donc diffuse dans le protoplasme et il n'existerait pas de noyau.

Macallum étudie en outre un certain nombre de champignons appartenant à d'autres genres (*Hyphelia terrestris*, *Agaricus, Cystopus candidus*, *Aspergillus glaucus*) et il constate partout la même particularité, seulement dans ces derniers la nucléine peut à certains stades du développement se condenser sous forme de véritables noyaux.

Buscalioni (1896), prenant comme sujet d'études le *S. guttulatus* (Robin), parasite de l'intestin du cobaye, fait une étude très soigneuse de la structure de ce blastomycète. Il fixe au moyen de la coagulation par la chaleur et emploie l'hématoxyline de Boehmer comme matière colorante. Il observe dans chaque cellule deux vacuoles occupant les deux pôles, et laissant entre elles un espace protoplasmique très dense et imprégné de glycogène, où se trouve situé le noyau. Ce noyau se laisse apercevoir à l'état frais comme une masse arrondie, un peu plus réfringente que le protoplasme. Il se colore facilement avec l'hématoxyline et apparaît comme une masse homogène. La division se fait par amitose : le noyau s'étire, pénètre dans le jeune bourgeon, se rétrécit dans le col et se divise en deux portions. Le protoplasme renferme quelquefois des granulations qui fixent l'hématoxyline et qui sont considérées par Buscalioni comme des matières de dégénérescence.

Au moment de la sporulation, le protoplasme devient granuleux et les granules se condensent pour former les spores. Ces granulations paraissent être de nature graisseuse, car elles brunissent par l'acide osmique. En même temps le noyau se divise en autant de noyaux filles qu'il y aura de spores. Cette division paraît s'opérer suivant un mode différent de celui du bourgeonnement et qui rappelle la karyokinèse.

Errera et Laurent (1897), dans le texte de leurs planches physiologiques, figurent des cellules de *S. cerevisiæ* avec un noyau qu'ils colorent à l'hématoxyline et dont ils affirment l'existence.

Vers la même époque (1897), Casagrandi fait une étude détaillée de la membrane des levures et en profite pour toucher à la question du noyau qu'il colore à l'hématoxyline, et sur lequel il se propose de revenir dans une étude postérieure. Dans le protoplasme il distingue des granules réfringents qui sont localisés soit dans le protoplasme soit dans l'intérieur des vacuoles; ces granules sont disposés d'une manière très variable; souvent ils rappellent le centralfalden de Hieronymus. Vill avait déjà signalé dans les levures des granules qu'il considérait comme des globules d'huile. Casagrandi confirme cette manière de voir et montre que ces granules se dissolvent après un traitement prolongé dans l'éther et qu'ils

brunissent par l'acide osmique. Ils joueraient le rôle de matières de réserve.

Hans Ziemann (1898) essaie un nouveau procédé de double coloration (bleu de méthylène et éosine) qui lui donne des résultats satisfaisants chez les protozoaires, les champignons et les bactéries. Il décrit chez quelques champignons *(Oïdium lactis, Oidium albicans, S. cerevisiæ, S. niger)* un noyau se teignant en rouge, contenu dans une zone achromatique et qui se détache du protoplasme coloré en bleu. Ce noyau est susceptible de se diviser et il peut exister jusqu'à seize noyaux dans chaque cellule.

En présence des divergences d'opinion régnant jusqu'alors sur le noyau des levures, Bouin (1898) essaie de trancher la question, et entreprend une série de recherches sur un certain nombre de levures *(S. pastorianus, S. cerevisiæ, S. Ludwigii, S. mycoderma, S. tumefaciens)*. Les résultats les plus favorables sont obtenus avec l'hémalun et surtout l'hématoxyline de Heidenhain après fixation à l'alcool ou au sublimé. Il constate la présence d'un noyau qui est quelquefois homogène, mais qui souvent se montre constitué d'une membrane d'enveloppe et d'un nucléoplasme contenant des granules colorables de chromatine. Ce noyau est souvent d'un contour irrégulier qui semblerait dû à des mouvements amiboïdes. Pendant la fermentation, le

noyau envoie des prolongements de tous côtés et se met en relation avec le protoplasme, prenant ainsi des formes étoilées. Le mode de division le plus fréquent pendant le bourgeonnement est l'amitose ; cependant, dans le *S. Ludwigii* et dans le *S. mycoderma vini* et *cerevisiæ* on constate des divisions particulières que l'auteur considère comme intermédiaires entre la division directe et la karyokinèse.

En plaçant le *S. cerevisiæ* dans le milieu où l'avait cultivé Hieronymus, c'est-à-dire dans une solution de 20 p. 100 de saccharose, Bouin obtient une structure qui rappelle celle qu'avait décrite cet auteur. Cette cellule se remplit de granules qui se disposent souvent en spirales comme le centralfaden et qui paraissent posséder les réactions de la nucléine ; ce seraient des noyaux. Un tel milieu de culture semble d'une trop forte concentration pour la levure, qui se gonfle et arrête son bourgeonnement sans que le noyau cesse de se diviser et l'on obtiendrait ainsi des cellules plurinucléées. Ces divisions successives du noyau dans une même cellule sans partage de la cellule ont été constatées par plusieurs observateurs dans des cellules placées dans des conditions défavorables, et l'auteur considère cette anomalie comme provenant de la trop forte concentration du milieu qui amènerait un état pathologique de la cellule.

Dans la sporulation, le noyau paraît se diviser constamment par un mode intermédiaire entre la mitose et l'amitose.

Janssens (1898) reprend de nouvelles recherches cytologiques sur les levures en collaboration avec Leblanc et publie un important mémoire sur la question. La méthode de ces auteurs consiste en une fixation par le procédé de Moeller et une coloration à l'hématoxyline au fer. Leur étude porte sur *S. cerevisiæ*, *S. Ludwigii, S. pombe*, *S. octosporus*. Ils constatent toujours l'existence d'un corps nucléaire. Ce noyau est constitué par une membrane, un karyoplasme incolore et un nucléole. Au début de la fermentation, le noyau se vacuolise. Il se présente à l'état frais sous la forme d'une vacuole renfermant une sphérule animée de mouvements browniens ; bientôt après, il se ramasse sur lui-même et le protoplasme se vacuolise à ses dépens. Enfin, à la faveur d'une nutrition très favorable, le protoplasme comble ces vacuoles et la levure prend en frais l'aspect d'un globule uniformément dense et réfringent. A ce stade la levure fixée présente un protoplasme à structure réticulée typique. Des granules fortements colorés par l'hématoxyline peuvent naître dans les nœuds des trabécules protoplasmiques, où ils sont à l'état d'enclaves. Ces granules correspondraient

aux granules de Raum et à ceux de Hieronymus. Ils disparaissent avant la formation des spores et doivent être considérés comme des intermédiaires. Ils seraient de nature nucléo-albuminoïde.

Dans les cellules vieilles, le noyau peut se vacuoliser de nouveau et la cellule revient à son état primitif.

La division du noyau s'effectue dans le bourgeonnement par le mode direct (*S. cerevisiæ*), mais aussi très souvent par le mode indirect (*S. Ludwigii*, *S. octosporus*).

Dans les cellules qui se préparent à sporuler, Janssens et Leblanc croient observer une division du noyau en deux noyaux filles qui semblent se séparer complètement, restent quelque temps très rapprochés l'un de l'autre, puis se refusionnent. Ils rapprochent ce phénomène des *conjugaisons nucléaires* découvertes par Dangeard et Sappin-Trouffy chez certains champignons et admettent que la cellule mère de *l'asque* a la valeur d'un *œuf fécondé*. Ce n'est qu'après cette division préalable suivie d'une refusion, que s'effectue la division ayant pour but de fournir un noyau à chaque spore. Cette division se fait par karyokinèse.

Malgré ces derniers travaux qui semblaient démontrer définitivement l'existence d'un noyau dans les cellules de levure, la question était

encore très contestée, lorsque Wager reprit cette étude et publia en 1898 un travail d'une remarquable précision. Il observe le *S. cerevisiæ*, le *S. pastorianus*, le *S. Ludwigii*, le *S. mycoderma* et une levure rose trouvée dans son laboratoire. Il essaie un grand nombre de fixateurs et s'arrête au sublimé qui lui donne les meilleurs résultats. Il expérimente également beaucoup de matières colorantes : hématoxyline de Delafield, hématoxyline au fer, violet de gentiane, safranine, carmin et nigrosine, bleu de méthylène et fuchsine, bleu de méthylène et éosine ; mais les préparations les plus favorables lui sont fournies par les mélanges de vert de méthyle et de fuchsine.

Il décrit au début de la fermentation, chez le *S. cerevisiæ*, un noyau (*noyau des auteurs*), de structure toujours homogène, et qui ne colore jamais d'une façon très vive. Cet élément toujours accolé à la vacuole correspondrait au *nucléole*. Cette vacuole qu'il désigne sous le nom de *vacuole nucléaire*, en s'appuyant sur les observations d'Eisenchitz, contient toujours un certain nombre de granules, quelquefois groupés en réticulum très fin, et qui se teignent d'une manière intense avec la plupart des colorants. Ces granules résistent à l'action de la pepsine, de même que le *nucléole;* il les considère comme étant de nature chromatique. L'ensemble de

cette vacuole remplie de granules chromatiques et de ce nucléole toujours en contact avec cette vacuole, constituerait, selon lui, le noyau (*appareil nucléaire*).

Il peut exister en outre, en dehors de la vacuole, des granules disséminés dans le protoplasme, qui se colorent également. Les uns, rougissant par la teinture d'alkanna, semblent appartenir à la catégorie des globules d'huile. Les autres seraient des matières protéiques. Ces granules offrent parfois des dispositions qui rappellent le centralfaden de Hieronymus. Ils sont très souvent groupés autour d'un nucléole, paraissant servir à sa nutrition ; le nucléole ainsi entouré d'un amas de granules irrégulièrement disposés autour de lui prend alors des formes étoilées, qui lui donnent l'aspect décrit par Bouin pendant la fermentation.

A une période plus avancée de la fermentation, la vacuole nucléaire disparaît et on voit se former une énorme vacuole imprégnée de glycogène, qui refoule le protoplasme à la périphérie de la cellule. Le protoplasme est alors réduit à une mince couche pariétale, contenant sur un de ses côtés le nucléole et les éléments chromatiques disséminés autour du nucléole. Cette vacuole n'a ni la structure, ni le même rôle que la vacuole nucléaire.

Dans les jeunes cellules, on trouve souvent de nombreuses vacuoles nucléaires; elles semblent se fusionner pour former la vacuole unique qu'on trouve au début de la fermentation.

La division du noyau pendant le bourgeonnement se produit toujours par amitose. La vacuole nucléaire pousse dans le jeune bourgeon un prolongement dans lequel s'accumulent un certain nombre de granules de chromatine et qui se séparent par constriction de la vacuole primitive; le nucléole subit en même temps un phénomène analogue pour donner deux nucléoles fils.

Chez le *S. Ludwigii*, il existe ordinairement deux vacuoles situées aux deux pôles de la cellule et une vacuole nucléaire toujours en contact avec le nucléole et au milieu de la cellule. Quelquefois cependant cette vacuole reste éloignée du nucléole, mais en ce cas lui est toujours unie par un mince filet de granules chromatiques.

Au moment de la sporulation, on observe une division de la vacuole nucléaire qui aboutit à une vacuolisation complète du protoplasme lequel prend alors un aspect rappelant la structure de Butschli. Les granules chromatiques se placent alors au voisinage du nucléole qui occupe le centre de la cellule, puis ils

disparaissent en partie, paraissant absorbés par le nucléole dans lequel se condenserait tout le noyau ; et à ce moment commence la division du noyau par un procédé qui rappelle un peu la karyokinèse. Le protoplasme se rassemble autour du noyau et se partage en autant de masses qu'il y a de spores. Les spores naissent d'abord très petites, puis grossissent peu à peu en absorbant le reste du protoplasme de la cellule mère. Chaque spore possède un noyau constitué uniquement d'un nucléole accolé à l'un des côtés de la membrane et d'où part un protoplasme rayonnant. Wager n'a jamais observé de conjugaisons nucléaires précédant la division, comme l'avaient signalé Janssens et Leblanc.

L'auteur, ayant remarqué la même structure avec vacuoles nucléaires et nucléoles chez un Mucor qui s'était développé accidentellement dans les cultures, se demande si cette structure ne serait pas répandue chez beaucoup de champignons inférieurs (1).

Cette interprétation toute nouvelle a l'avantage de concilier les deux opinions contradictoires qui partageaient les observateurs qui

(1) Vuillemin avait déjà remarqué dans l'*Entomophtora glaeospora* des noyaux accolés à des vacuoles, limités par une sorte de membrane très délicate et renfermant quelques fines granulations de chromatine.

avaient étudié la structure des levures. La précision de ces recherches, le grand nombre de méthodes de coloration essayées, joints à la notoriété de l'auteur, donnèrent une très grande importance à ces observations qui semblaient définitivement résoudre ce problème si complexe.

Aussi ce travail fut-il très bien accueilli par la plupart des botanistes (Matruchot, *Revue gén. de bot.;* Poirault, *Année biologique;* Errera, *Bull. de l'Université de Bruxelles*) (1).

II. — Technique

Méthodes de culture. — Il est nécessaire, si l'on veut obtenir des préparations suffisantes pour observer la structure du noyau et sa division, de prendre comme objet d'études des cellules jeunes et vigoureuses, dans lesquelles le protoplasme est encore dense et homogène. Plus tard les vacuoles augmentent de volume, se fusionnent et repoussent le protoplasme vers la périphérie de la cellule : le noyau se trouvant ainsi comprimé entre la vacuole et la membrane

(1) Poirault, dans son compte rendu de l'*Année biologique*, serait disposé à considérer le noyau de Wager comme un centrosome.

se déforme, se contracte et devient fort difficile à différencier ; en même temps le protoplasme et les vacuoles se remplissent de produits de nutrition qui sont susceptibles de prendre la couleur d'une manière plus intense que le noyau et exposent à des erreurs d'interprétation. Il faut en outre que les cellules examinées aient vécu dans un milieu très favorable afin d'éviter les phénomènes de dégénérescence précoce.

Les liquides que nous avons le plus souvent employés sont : le liquide Pasteur et le liquide Mayer; ce sont du moins ceux qui paraissent les plus propres à la végétation des levures, sauf de très rares exceptions. Pour l'étude des moisissures (*Dematium* et *Oïdium*) nous avons substitué à ces liquides le liquide Raulin, qui nous a paru particulièrement favorable à leur développement. Nous n'avons jamais employé que des cultures pures. Ces liquides étaient placés dans des flacons d'Erlenmayer et stérilisés à l'autoclave.

Pour ce qui concerne les phénomènes de sporulation, nous avons utilisé quelquefois des blocs de gypse suivant le procédé ordinaire, mais seulement dans les cas où la formation des spores s'obtenait difficilement. Cette méthode a en effet le grand inconvénient de provoquer quelquefois une dégénérescence partielle du

protoplasme et de déformer les cellules. Enfin elle ne réussit à la production des spores que lorsque les cellules ont séjourné préalablement dans un milieu très nutritif. Le meilleur procédé est la culture sur tranches de carotte suivant la méthode de Reess. La carotte constitue un milieu défavorable à la vie de la levure puisqu'elle amène la sporulation, mais qui paraît cependant très nutritif. Les cellules placées dans de telles conditions se multiplient assez abondamment, accumulent une très grande quantité de produits de réserve et la sporulation s'obtient ordinairement très vite, au bout de deux ou trois jours. Ce procédé a l'avantage de permettre de suivre tout le cycle évolutif du développement d'une levure. L'étude des germinations peut aussi se faire facilement par ce même genre de culture; en y plaçant, à l'aide d'un fil de platine, une certaine quantité de levures ayant sporulé, et en l'y laissant quelques heures, on peut obtenir tous les stades de germination de la spore. Un autre procédé très commode consiste à mettre dans un petit cristallisoir contenant quelques gouttes de liquide Pasteur une certaine quantité de spores. On peut également se servir avec avantage des cultures sur cellules Van Tieghem; on suit les phénomènes de germination à l'aide du microscope et dès que le développement des spores a atteint le stade que l'on veut

étudier, on enlève la lamelle recouvrant le dispositif, on laisse évaporer la gouttelette de liquide nutritif et on fixe en plongeant la lamelle dans le bain fixateur. Le défaut de cette méthode est de contracter les cellules pendant la dessiccation et de donner de mauvaises fixations.

Procédés pour recueillir les cellules. — Le moyen le plus commode et le plus souvent employé pour l'étude des êtres mono-cellulaires est la méthode des frottis : elle consiste à promener un fil de platine contenant un certain nombre de cellules sur un cover ou sur une lame de verre, enduits d'une légère couche d'albumine afin de faciliter l'adhérence des cellules sur le verre; puis, la dessiccation faite, on plonge le cover ou la lame dans le bain fixateur. Wager a fait remarquer que ce procédé déterminait une assez forte contraction des cellules ; aussi préfère-t-il déposer une certaine couche de levure dans le bain fixateur et ne se sert de la méthode des frottis que pour la coloration ; nous avons constaté le même fait et comme d'autre part, il est difficile de faire des frottis humides sans perdre la plus grande partie des cellules disposées sur le cover, nous avons employé le procédé de Wager. Lorsque nos levures provenaient de cultures sur carotte, nous raclions à l'aide d'un scalpel la couche de levure déposée

sur le substratum et nous la placions dans le bain fixateur. Pour les cultures en milieu liquide, l'opération est plus compliquée et nous devions filtrer et recueillir le résidu. Malgré cela, nous avons presque toujours observé que l'emploi des frottis même après la fixation offrait de sérieux inconvénients. Il amène toujours une contraction de la cellule, et soit par suite de cette contraction, soit que la pénétration soit entravée, une partie de la surface de contact adhérente au cover ne recevant pas la couleur, les colorations ne sont jamais très bonnes. Nous avons pu nous persuader par un grand nombre d'observations que la contraction du noyau avait eu une large part dans les insuccès de beaucoup des histologistes qui ont étudié la structure des levures (1). Pour y remédier nous avons essayé de faire des cultures sur milieux solides (carotte, pomme de terre) et lorsque nous voulions examiner la culture, nous coupions une légère tranche du substratum chargé de levure que nous déposions, après avoir fixé,

(1) Il existe toujours une différence très sensible entre les préparations obtenues à l'aide de la méthode des frottis (soit avant, soit après la fixation) et celles qu'on a faites par les procédés que nous indiquons. Dans les premières, le noyau très contracté a un aspect presque toujours homogène; dans les secondes au contraire, il montre une structure distincte.

dans le bain colorant, puis dans le bain décolorant et l'opération terminée nous raclions la couche de levure qui remplissait ce substratum pour en déposer une partie sur une préparation. De cette façon on pouvait colorer les cellules sans les déposer sur un cover et sans s'exposer à les perdre dans le bain colorant. Un tel procédé ne nous a jamais donné de résultats satisfaisants. La carotte se colore fortement et il reste sur la lamelle des cellules de carotte mêlées aux levures, qui empêchent d'avoir des préparations suffisamment nettes. D'autre part, une certaine quantité de levure disparaît dans ces bains successifs et ce qui reste se colore difficilement.

Le procédé qui nous a donné les meilleurs résultats est le suivant : on sème dans un liquide Pasteur, en même temps que la levure, un champignon capable de vivre dans ce milieu sans gêner le développement de la levure, tel par exemple le Penicillium glaucum. Au bout de quelques jours, on prend à l'aide d'une aiguille une petite portion du mycélium, on la fixe et on la colore et il reste toujours une forte proportion de cellules de levure enchevêtrées dans le mycélium. Lorsqu'on a étalé le fragment de mycélium sur la lame on aperçoit très distinctement les cellules de levure dans les interstices, sans que la moisissure gêne en quoi que ce soit la netteté de la préparation.

Cette méthode compliquée ne nous a servi que dans les cas difficiles où il nous fallait chercher à différencier la structure du noyau ou étudier sa division. Dans les autres cas la méthode des frottis après la fixation, et souvent même avant la fixation, nous a été largement suffisante.

Fixation. — Les agents de fixation dont nous avons fait usage sont: la chaleur, la liqueur de Flemming, le sublimé, l'alcool à 95° et les solutions aqueuses saturées d'acide picrique. La fixation par la chaleur, qui consiste à promener les frottis pendant quelques instants sur une flamme, contracte fortement le protoplasme, mais malgré cela, peut donner dans certains cas des préparations suffisantes. Cette méthode a l'avantage d'être rapide et nous l'avons employée dans des observations qui ne demandaient pas une grande précision. En comparant les divers autres fixateurs, nous avons pu constaté qu'ils étaient tous capables de donner des résultats satisfaisants. La liqueur de Flemming n'a cependant pu être employée que rarement: elle entrave en effet les colorations à l'hématoxyline qui sont les seules qui permettent de différencier le noyau d'une façon suffisamment précise. L'alcool à 90° ou à 95° et le sublimé nous ont paru favorables : dans

certains cas avec la fixation par la chaleur c'est la méthode qui permet de se rendre le mieux compte des corpuscules métachromatiques. Les autres procédés de fixation et surtout l'acide picrique rendent la plupart du temps leur coloration un peu plus difficile et moins régulière. L'alcool a le désavantage de provoquer quelques contractures du protoplasme. Le fixateur qui nous a rendu le plus service et que nous recommandons le plus particulièrement pour l'étude du noyau est sans contredit l'*acide picrique* en solution aqueuse concentrée. Un lavage très soigneux dans l'alcool à 70° est nécessaire.

Méthode des coupes. — Wager a employé pour la première fois, dans l'étude histologique des levures, la méthode des coupes à la paraffine. Il place une portion de levure colorée par le carmin et la nigrosine (Hartog) dans un petit flacon, dans lequel il verse de l'alcool à faible degré qu'il remplace successivement par des alcools de plus en plus forts, du xylol, et enfin de la paraffine, sans vider le contenu de levure renfermé au fond du flacon. Lorsque les levures ont séjourné pendant un temps suffisant dans la paraffine pure, il solidifie cette paraffine, casse le flacon et place un morceau du bloc ainsi obtenu sur le microtome.

Nous avons repris cette méthode tant chez les levures et chez les moisissures, et nous l'avons essayée avec un certain nombre de colorants (hématoxyline de Heidenhain, hémalun, carmin et nigrosine, violet de gentiane, etc.). Les coupes s'effectuent assez facilement; il y a peu de contraction dans les cellules et les résultats sont souvent satisfaisants. Nous n'avons, il est vrai, jamais obtenu à l'aide de cette méthode des préparations supérieures à celles que nous ont données les levures colorées sans avoir préalablement été coupées. Néanmoins le procédé est intéressant, il sert de contrôle dans les interprétations délicates et nous l'avons utilisé fréquemment.

Colorations. — Les colorations et surtout celles du noyau sont fort difficiles et cette difficulté provient de la forte colorabilité du protoplasme et de la présence d'un grand nombre de granules qui fixent les matières colorantes, plus énergiquement que le noyau, et que nous apprendrons à connaître sous le nom de *corpuscules métachromatiques*. Aussi est-il très délicat de différencier ces granules des noyaux et afin de ne pas nous exposer à de fausses interprétations, avons-nous jugé indispensable d'employer un très grand nombre de colorants et de comparer leurs effets.

Les colorants spécifiques de la nucléine (vert de méthyle, safranine), de même que le violet de gentiane et la fuschine, sont susceptibles de donner dans certains cas de bonnes préparations, mais la plupart du temps ils offrent des résultats insuffisants. Le carmin boracique ne différencie ordinairement pas le noyau. Le carmin de Meyer et la nigrosine suivant la méthode de Hartog sont quelquefois d'un bon secours. La nigrosine employée seule est également susceptible de colorer le noyau. Le bleu de toluidine (Maire) colore en rouge intense les corpuscules métachromatiques et laisse parfois apercevoir le noyau en bleu sombre.

Les méthodes de Wager (vert de méthylène et fuschine, éosine et bleu de méthylène, bleu de méthylène et fuschine), nous ont paru tout à fait défavorables à l'interprétation de la structure des levures ainsi qu'on le verra dans la suite ; elles ne permettent pas de différencier le noyau des corpuscules métachromatiques dont elles ne laissent pas apercevoir la coloration caractéristique.

Le rouge de Magenta nous a fourni quelquefois d'excellentes différenciations nucléaires : les corpuscules métachromatiques et le protoplasme se décoloraient et le noyau apparaissait en rouge.

Mais les colorants qui nous ont donné les

résultats les plus instructifs sont le *bleu de métylène* et *l'hématoxyline*.

Le *bleu de méthylène*, employé en solution aqueuse à 1 p. 100, colore le protoplasme en bleu clair et donne aux corpuscules métachromatiques une teinte variant du bleu intense légèrement violet au rouge vif. Le noyau se différençie quelquefois en bleu un peu plus sombre que le protoplasme. Le bleu polychromé d'Unna produit encore de plus belles colorations, mais qui se conservent plus difficilement : le protoplasme acquiert une teinte bleu pâle, et les corpuscules métachromatiques se colorent toujours en rouge étincelant. Le bleu Borel (Laveran) ne différencie ordinairement pas les noyaux et n'offre pas des résultats supérieurs à ceux obtenus par le bleu de méthylène pour ce qui regarde les corpuscules métachromatiques. Ces trois colorants sont les plus utiles pour l'étude du protoplasme et des corpuscules métachromatiques.

Le noyau au contraire ne se différencie clairement qu'avec les colorants hématoxyliques, surtout après fixation à l'acide picrique. Les hématoxylines de Delafield et Grenacher fournissent des résultats satisfaisants, mais nous nous sommes mieux trouvé de l'hématoxyline de Bœhmer. On emploie des solutions diluées et on laisse l'objet pendant un temps qui varie

d'une demi-heure à vingt-quatre heures; puis on lave pendant vingt-quatre heures dans une solution à 1 p. 100 d'alun. Les corpuscules métachromatiques se décolorent en grande partie; le noyau apparaît dans une teinte bleu foncée.

L'hémalun fournit des résultats équivalents en ce qui concerne le noyau, mais a l'avantage d'être beaucoup plus rapide et de différencier à la fois les corpuscules métachromatiques et le noyau. La coloration dure dix minutes ou une demi-heure au maximum et on lave quelques instants à l'eau distillée. Le noyau se différencie du protoplasme bleu clair en bleu mat un peu plus sombre. Dans les cas les plus favorables, on aperçoit les détails de sa structure. Enfin les corpuscules métachromatiques restent colorés en rouge sombre.

Le procédé qui nous a donné les plus belles préparations pour le noyau, est *l'hématoxyline au fer de Heidenhain*. Il consiste à mordancer pendant une durée de temps qui varie de quatre à six heures dans une solution de fer ammoniacal à 2 1/2 p. 100. On lave à grande eau et on colore pendant vingt-quatre heures dans une solution d'hématoxyline à 1 p. 100. On décolore dans la solution d'alun de fer.

On obtient par ce procédé des préparations où l'on distingue avec la plus grande netteté

les noyaux avec leur structure et les phases de leur division, qui se détachent en noir sur un protoplasme incolore. Pour avoir une netteté encore plus grande, il est facile de colorer le protoplasme avec l'éosine. Les corpuscules métachromatiques se colorent également en noir, mais l'alun de fer les décolore généralement avant le noyau. Malheureusement cette méthode donne des résultats très irréguliers et à côté de très bonnes préparations elle peut produire, sans qu'on en connaisse bien la raison, des colorations anormales qui ont exposé les auteurs à de graves confusions; aussi afin de remédier à cet inconvénient, avons-nous toujours comparé les résultats que nous obtenions à l'aide de ce procédé à ce que nous donnait l'hémalun dans les mêmes circonstances.

Conservation des préparations. — Il est très difficile de conserver les préparations; celles qui sont colorées par l'hémalun ou par l'hématoxyline au fer peuvent se maintenir assez longtemps sans s'altérer; il est au contraire impossible de conserver les préparations obtenues à l'aide du bleu de méthylène ou du bleu polychrome, car les corpuscules métachromatiques perdent très facilement leur coloration, dans quelque substance qu'on les place.

Nous avons essayé pour les premières le

baume de Canada, mais ce procédé détermine une grande contraction des cellules et surtout des noyaux qui perdent leurs caractères de structure.

La *glycérine gélatinée* contracte beaucoup moins, et c'est la méthode que nous avons adoptée.

Nous nous sommes mieux trouvé encore de la glycérine aqueuse ; malheureusement, elle décolore assez vite les préparations et ne permet guère de les conserver plus de quelques mois.

CHAPITRE II

Dematium (species)
Oïdium Lactis (Fresenius)

I. — Dematium (species)

Ce *Dematium* a été rencontré par nous sur du bois mort humide, où il formait de petites taches visqueuses d'un rouge orangé. Cette coloration ne se conserve pas dans les cultures artificielles, cependant dans les cultures âgées, le champignon peut prendre, lorsqu'il n'est pas cutinisé, une couleur rose ou jaunâtre quelquefois assez accentuée. Il se développe abondamment sur les tranches de carotte qu'il recouvre d'un mycélium très épais et blanchâtre, qui par son aspect visqueux et duveté ressemble à l'*Oïdium lactis*. Il se cultive facile-

ment dans le liquide Raulin, mais ne produit, ainsi que dans la plupart des milieux liquides, que des lambeaux de mycélium, les formes levures étant prédominantes.

Ce champignon offre tous les caractères génériques d'un Dematium. Le thalle varie beaucoup quant à la dimension et à la longueur des articles. Chaque article produit ordinairement un nombre plus ou moins grand de conidies, qui bourgeonnent à leur tour et fournissent une abondante prolifération de conidies levures. Ces conidies ont l'aspect des levures typiques ; elles sont généralement allongées et effilées à leurs deux extrémités. Leurs dimensions varient beaucoup ; les plus petites ont 4 μ sur 3 ; 8 à 9 μ sur 3 à 5 paraissent être les dimensions normales. Le plus grosses atteignent 14 μ sur 4, mais ce chiffre peut être dépassé de beaucoup au moment où elles se préparent à germer ; elles se gonflent alors, s'allongent et se cloisonnent, tout en continuant pendant quelque temps à bourgeonner.

Le mycélium est capable souvent de se dissocier et de donner un certain nombre d'*oïdies* ressemblant à celles de l'*Oïdium lactis* et chacune d'elles peut bourgeonner et produire des conidiés levures. Il se forme parfois aussi, en certains endroits, des filaments mycéliens par gonflement et cloisonnement multiples de

certains articles en tous sens, des amas de cellules arrondies, correspondant à ce que Planchon désigne sous le nom de *spores en massif*.

Dans les vieilles cultures on observe souvent une abondante cutinisation du mycélium et des conidies levures, donnant lieu aux *formes fumagoïdes* caractéristiques des Dematium.

Dans quelques cas, nous avons constaté la présence de *pycnides*. Malheureusement, ces formations n'ont apparu que dans les premiers temps que nous cultivions ce champignon ; nous ne les avons plus obtenues depuis et nous ne les avions pas examinées d'une façon suffisamment précise pour affirmer qu'elles ne provenaient pas d'une impureté de la culture.

Nous n'avons pas pu déterminer l'espèce de ce Dematium. Par la forme et la dimension de ses conidies levures, il offre assez de ressemblance avec le *Dematium pullulans*, mais il s'en distingue par la couleur rose qu'il offre dans les vieilles cultures et qu'il paraissait avoir dans les milieux où nous l'avons recueilli, ainsi que par l'existence probable des pycnides.

Aspect du champignon à l'état frais. — Au début du développement et examiné à l'état frais, le protoplasme paraît très dense et uniforme : il y a cependant de très petites vacuoles

parsemées de côté et d'autre, renfermant un ou plusieurs granules très réfringents animés de mouvements browniens. Les noyaux se distinguent parfois comme des espaces sphériques légèrement plus brillants que le protoplasme. Plus tard les vacuoles augmentent de nombre et de volume et l'on y voit se mouvoir une grande quantité de granules de dimensions très variables, dont les plus gros se montrent sous forme de gros globules sphériques et dont les plus petits réunis les uns aux autres, présentent par leur ensemble l'aspect d'un fin réticulum. Les vacuoles se rapprochent, se fusionnent et finissent par constituer une seule vacuole par article, refoulant le protoplasme à la périphérie et traversées à certains endroits par quelques brides protoplasmiques, débris des espaces limitant les vacuoles primitives. Les granules s'accroissent considérablement et constituent de grosses boules sphériques.

Dans les vieilles cultures, le protoplasme se transforme en petites masses très réfringentes, à contour irrégulier et de consistance semi-liquide, qui se soudent les unes aux autres en formant de gros amas se distinguant des granules antérieurs par une moindre consistance et par une moindre réfringence et qui proviennent d'une dégénérescence graisseuse du protoplasme. Dans les cultures très âgées, une grande

partie de la masse protoplasmique s'est transformée en globules d'huile et ces globules, entourés de quelques lambeaux protoplasmiques, sont condensés vers le centre; tout le reste est rempli d'un liquide cellulaire, dans lequel nagent encore quelques granules, la plupart de ces derniers ayant disparu en presque totalité au cours de la dégénérescence.

Les conidies levures subissent une évolution parallèle. A leur naissance, elles renferment une vacuole provenant d'un prolongement d'une vacuole du filament qui lui a donné naissance et qui s'est séparée ensuite de la vacuole mère en lui prenant une partie de ses granules. Dans la suite on distingue le plus souvent deux vacuoles occupant les deux pôles de la cellule. Dans les cultures anciennes, on observe une dégénérescence graisseuse identique à celle que nous avons constatée dans le mycélium.

Action des colorants. — Si l'on traite le champignon par la solution iodo-iodurée de Gram, le protoplasme prend une coloration jaune et les granules se teignent très légèrement en jaune pâle. Dans le protoplasma, on aperçoit souvent de place en place quelques taches brillantes qui restent incolores et qui représentent les noyaux. Le glycogène n'existe qu'exceptionnellement.

L'éosine (1) donne une coloration rose du protoplasme et laisse les granules incolores. Les noyaux ne se différencient ordinairement pas.

Le vert de méthyle colore le protoplasma en vert pâle et donne quelquefois aux noyaux une teinte un peu plus sombre. Les granules se colorent intensivement en bleu foncé, parfois légèrement violet.

Avec la safranine, le protoplasme se teint en rose et les noyaux se distinguent parfois avec une couleur rouge foncée. Les granules se colorent en rouge, mais sans grande intensité.

Avec la fuschine, on obtient au contraire une coloration intensive des granules en rouge; le protoplasme devient rouge clair et les noyaux se différencient par une teinte plus foncée.

Le violet de gentiane colore le protoplasme en bleu violet, les noyaux se dessinent ordinairement comme des taches plus foncées et les granules prennent une couleur nettement rouge.

Le bleu de méthylène et le bleu Borel teignent le protoplasme en bleu verdâtre, les noyaux se laissent rarement apercevoir comme des masses d'une teinte un peu plus vive et les granules ont une nuance qui varie du bleu

(1) Les différents fixateurs que nous avons essayés laissent toujours subsister la structure que nous avons observée à l'état frais, avec seulement quelques contractures dans certains cas et notamment avec l'alcool ou la coagulation par la chaleur, aussi ne parlons-nous pas de leur action.

intense légèrement violet ou rouge sombre (1) (Pl. IX, fig. de 17 à 24).

Le bleu polychrome donne des résultats analogues, mais les préparations sont beaucoup plus nettes : le protoplasme apparaît en bleu clair et les granules se différencient toujours avec une belle couleur toujours rouge vif (Pl. IX, fig. de 12 à 16).

Avec les mélanges de fuschine et de vert de méthyle suivant les méthodes employées par Wager, le protoplasme se teint en violet ainsi que les noyaux, et les granules se colorent en rouge foncé ou en bleu intense, selon la proportion de fuchsine contenue dans le mélange.

Les mélanges de bleu de méthylène et de fuschine fournissent des résultats semblables et les granules apparaissent avec une couleur bleu foncé avec parfois un reflet légèrement violacé.

Il en est de même des mélanges d'éosine et de bleu de méthylène. Ces granules se comportent donc comme les granules chromatiques de Wager avec ces trois derniers colorants.

L'hémalun et les diverses hématoxylines colorent le protoplasme en bleu ; les noyaux se détachent sous forme de masses arrondies avec une teinte mate un peu plus foncée, entourée

(1) Nous expliquerons ces variations de coloration dans le chapitre consacré aux corpuscules métachromatiques.

d'une aréole incolore de nucléoplasme laissant distinguer, si la décoloration a été bien effectuée, une membrane très nette (Pl. IX, fig. de 1 à 11).

L'hématoxyline au fer de Heidenhain laisse presque toujours apercevoir les noyaux avec une couleur noir foncé et montrent très nettement leur structure. Le protoplasme est entièrement décoloré, de même que les granules qui ne s'aperçoivent que par leur réfringence. Dans d'autres cas une partie des granules restent colorés en noir et ils se distinguent des noyaux par leur homogénéité et surtout par la variabilité de leur dimension et de leurs formes et leur position dans l'intérieur des vacuoles. Dans quelques cas et sans qu'on en puisse connaître la cause, les granules se colorent seuls et les noyaux n'apparaissent pas.

Ainsi, il existe dans les cellules de ce champignon *un protoplasme qui se colore fortement par toutes les matières colorantes*, *des noyaux* au nombre de plusieurs par article, qui ne se révèlent distinctement que par les couleurs hématoxyliques, et *enfin des granules en nombre considérable*, qui se trouvent presque toujours *localisés dans les vacuoles* et qui possèdent *une très grande affinité pour les matières colorantes*, avec lesquelles ils prennent en général *une couleur rouge*.

Étudions maintenant les détails de ces différentes parties.

Protoplasme. — Le protoplasme, sur les extrémités des filaments en voie de croissance, apparaît presque homogène avec quelques petites vacuoles. Cependant les diverses colorations lui donnent un aspect légèrement granuleux, mais ne laissent apercevoir aucune structure déterminée.

Noyaux. — Les noyaux sont en nombre très variable dans les articles (Pl. I, fig. de 1 à 7, et Pl. IX, fig. de 1 à 5). Leur nombre dépend de la longueur des articles, laquelle varie considérablement. Cependant d'une manière générale les articles sont très allongés et contiennent un grand nombre de noyaux. Ces noyaux sont disposés de côté et d'autre dans le plasme; quelques-uns sont en contact direct avec les vacuoles; d'autres sont logés dans des parties protoplasmiques très éloignées des vacuoles. Souvent ils sont assemblés par groupes, provenant d'une série de divisions. On en trouve jusqu'à l'extrémité terminale de la cellule. Leur diamètre est variable suivant la dimension du filament, mais ne diffère jamais beaucoup dans une même cellule. Il oscille ordinairement entre 1 μ et 2,5 μ.

Ces noyaux sont assez difficiles à différencier, cependant l'hémalun est susceptible de donner de très belles préparations, mais ne les laisse apercevoir qu'après une décoloration très lente et souvent même ne les montre que sous forme de masse homogène. Il faut surtout avoir recours à l'hématoxyline au fer pour pouvoir étudier les détails de leur structure. Ils sont constitués d'*un nucléohyaloplasme incolore*, entouré par *une membrane très nettement colorée* et d'*une masse de forme arrondie* ou *ellipsoïdale fortement colorable*. Cette masse chromatique, tantôt apparaît au milieu du nucléohyaloplasme, tantôt est accolée sur une des parties de la membrane, mais on peut dire, d'une manière générale, qu'elle est périphérique et sa disposition au milieu du nucléohyaloplasme ne dépend que de la position dans laquelle se voit le noyau. Parfois la masse chromatique est très pauvre, paraît même disparaître en presque totalité et l'on n'aperçoit que la membrane et le nucléohyaloplasme. Les noyaux sont presque toujours sphériques, cependant dans les filaments très jeunes, où ils sont comprimés par un protoplasme très épais, ils peuvent subir certaines déformations. Ils s'allongent et prennent des formes un peu irrégulières (Pl. I, fig. 7 et 14) qui tiennent à une certaine plasticité de leur substance, mais

non à des mouvements amiboïdes. Les noyaux sont pourtant d'ordinaire beaucoup moins plastiques que le protoplasme et lorsque ce dernier se trouve réduit à l'état d'une mince couche périphérique entourant la vacuole, il pent arriver que les noyaux subissent la pression du suc cellulaire sans être aplatis et on trouve des noyaux faisant saillie au dehors du protoplasme et situés en partie dans la vacuole elle-même.

Ces organes correspondent aux noyaux décrits chez les moisissures par Strasburger, Von Istwanfi, Dangeard, Léger, Guégen, etc., et leur nature nucléaire est incontestable. Ces auteurs observent chez différentes moisissures des noyaux formés d'un nucléole entouré d'un nucléoplasme incolore et quelquefois limité par une membrane, mais nous n'avons pas encore vu de structure aussi nettement exprimée que celles dont nous donnons le dessin d'après nos préparations. Nous avons observé en outre un certain nombre de moisissures dont quelques-unes avaient été précédemment étudiées et nous leur avons trouvé des noyaux présentant un aspect aussi net. (*Aspergillus variabilis*, *Strerig. matocystis nigra*, *Penicillium glaucum*, *Botrytis cinerea, Trichoderma viride*).

Dangeard et la plupart des auteurs considèrent la masse colorée du noyau comme un

nucléole. Guégen, dans l'incertitude, la désigne peut-être plus correctement sous le nom de *chromoblaste* que nous adopterons. Nous ne croyons pas que cette masse chromatique puisse être assimilée à un véritable nucléole ; elle ne paraît pas en avoir la fonction et comme on ne distingue aucun autre élément dans le nucléohyaloplasme, et que, d'autre part, c'est cette masse chromatique qui joue le rôle le plus important dans la division nucléaire ainsi que nous allons le voir, il semble qu'on soit obligé de reconnaître qu'elle constitue la partie fondamentale du noyau, dont la chromatine, au lieu de former un réseau, serait accumulée en un seul granule (1). Cette forme de noyau, qui semble très commune chez les Champignons inférieurs et qu'on retrouve chez certains Protozoaires, correspondrait donc aux *nucléoles-*

(1) Cependant on trouve dans le mycélium des Ascomycètes supérieurs et des Basidiomycètes des noyaux qui ont une stucture absolument semblable et qui au moment où ils ont subi la fusion qui précède la formation de l'asque ou de la baside, acquièrent une dimension beaucoup plus considérable et laissent apercevoir dans le nucléohyaloplasme quelques fines granulations chromatiques. On pourrait se demander si dans ce mycélium et chez notre champignon, cette chromatine ne serait pas adhérente à la membrane qui comme nous l'avons remarqué possède une grande affinité pour les matières colorantes. D'autres cas analogues ont été signalés récemment. Ces observations pourraient faire attribuer au chromoblaste la signification d'un véritable nucléole.

noyaux de Carnoy. On sait que l'existence de ces nucléoles-noyaux a été fort contestée.

Guignard, il est vrai, considère le nucléole comme un chromosome plus gros que les autres mais Zacharias a montré que ces deux éléments étaient chimiquement différents et que le nucléole ne contenait pas de nucléine. Cette question est donc très contestable. Quoi qu'il en soit, nous inclinerions à penser que le noyau de ces champignons est uniquement composé d'un nucléohyaloplasme, limité par une membrane et de chromatine condensée en une seule masse. Il n'existerait pas de nucléole. C'est peut-être l'interprétation la plus vraisemblable.

Division du noyau. — La division du noyau se manifeste par les stades suivants : on trouve des figures où le noyau s'est légèrement allongé et est formé de deux chromoblastes ayant quelquefois la forme de deux demi-disques se regardant par leur face diamétrale et très rapprochés l'un de l'autre (Pl. I, fig. 3, 8, 10, 14, 16, 26 et Pl. IX, fig. 3, 4, 10). Dans d'autres figures, le noyau est plus allongé et comprend deux chromoblastes distinctement séparés par un intervalle de nucléohyaloplasme. Enfin il arrive que l'on distingue, dans certains stades analogues, la formation d'une membrane séparatrice très mince. Dans beaucoup de cas, la

membrane ne se distingue pas pendant ces divisions, mais quelquefois elle se laisse apercevoir d'une façon très nette (Pl. I, fig. 10) et il semble qu'elle persiste toujours. Ces divisions se font, en effet, presque constamment dans les extrémités des filaments en voie de croissance et dans des endroits où le protoplasme par sa densité et sa forte coloration masque souvent la membrane des noyaux même à l'état de repos. Ces figures de division avaient été déjà constatées, avec moins de netteté, par Guégen et Dangeard, dans le *P. glaucum*, et par Bouin chez différentes levures. Ces auteurs s'accordent à considérer ces divisions comme des cas intermédiaires entre la mitose et l'amitose, comme des stades d'anaphase d'une karyokinèse dont les chromosomes ne se distingueraient pas, étant données leurs petites dimensions et dont l'ensemble apparaîtrait comme deux masses disposées aux deux pôles (1). Les figures de ces auteurs peuvent laisser le doute, mais les nôtres nous paraissent plus significatives et l'on voit les deux masses tellement uniformes que nous croyons pouvoir affirmer leur homogénéité. Il ne s'agirait donc pas d'une karyokinèse ; mais

(1) Ces figures de division pourraient en effet être rapprochées des divisions du micronucleus des infusoires observées par Balbiani, mais ici on ne distingue jamais les striations décrites par cet auteur.

comme d'autre part un pareil mode ne peut guère être exactement assimilé à un phénomène de fragmentation, qui donne lieu généralement à des divisions très irrégulières et inégales, nous croyons pouvoir le considérer comme un cas un peu particulier d'*amitose* qui serait commun à la plupart des champignons inférieurs et qui consisterait en une coupure de la masse chromatique en deux portions égales suivant sa partie médiane. Un pareil mode de division se rapprocherait donc à certains égards de la mitose, mais serait beaucoup plus voisin de l'amitose.

Formation et structure des conidies-levures. — Les conidies levures se forment surtout sur les extrémités des filaments en voie de croissance. Les noyaux s'y divisent abondamment de manière à fournir un noyau à chaque conidie.

Chacune de ces conidies apparaît d'abord sous forme d'un très petit bourgeon qui se développe peu à peu et dans lequel s'introduit l'un des noyaux et une partie de la vacuole du filament qui lui a donné naissance.

La conidie une fois séparée s'accroît, sa vacuole primitive, très petite à l'origine, augmente de volume, puis soit qu'elle se divise, soit qu'il se forme d'autres vacuoles, on distingue bientôt deux vacuoles ou deux groupes de

vacuoles qui se placent aux deux pôles de la cellule, la partie médiane étant occupée par un protoplasme très dense dans lequel est contenu le noyau (Pl. I, fig. 13, 14, 15 et fig. de 17 à 26).

Ce noyau est donc typiquement unique dans chaque cellule; mais une fois détachées du mycélium, les conidies ne tardent pas à donner lieu à un actif bourgeonnement de formes levures et leur noyau est sans cesse en voie de bipartition. Cette division précède ordinairement l'apparition des jeunes bourgeons et l'on comprend que l'on puisse rencontrer fréquemment plusieurs noyaux dans chaque cellule levure (Pl. I, fig. 15). Le noyau se divise de la même manière que dans les filaments. La division s'effectue ordinairement à l'endroit même où le noyau est situé, sans qu'il change de place et par conséquent le plus souvent dans la partie médiane de la cellule. Les nouveaux noyaux se dirigent ensuite aux deux extrémités de la cellule ou sur les parties latérales où se produisent les bourgeons. Nous n'avons observé aucune relation entre la position du noyau et le point de naissance des bourgeons, contrairement à ce qu'avait signalé von Istwanfi dans les conidies levures d'Ustilaginées et dans certaines moisissures.

Plus tard, le bourgeonnement cesse de se

produire, la culture étant épuisée ; les deux vacuoles de chacune de ces formes levures se réunissent ordinairement en une seule et le noyau est rejeté sur l'un des côtés de la membrane; puis commencent les phénomènes de dégénérescence.

Dans les oïdies, on remarque une ou plusieurs vacuoles et plusieurs noyaux. Le nombre de ces noyaux est variable (Pl. I, fig. 5, 9 et 12). Ces oïdies ont en somme une structure identique à celle que nous décrivons chez l'*Oïdium lactis.*

Corpuscules métachromatiques. — Ce champignon possède, comme nous l'avons dit, une richesse exceptionnelle de granules réfringents localisés le plus ordinairement dans les vacuoles. Nous les appellerons *corpuscules métachromatiques.* L'origine de ces corpuscules paraît liée à celle des vacuoles, car dès la naissance des vacuoles, on les voit déjà apparaître. Les filaments jeunes paraissent à première vue être exempts de vacuoles; ce n'est que plus tard que celles-ci se montrent définitivement. Cependant si l'on examine avec attention un filament en voie de croissance, on s'aperçoit qu'il contient une certaine quantité de granules entourés d'une zone hyaline. En suivant le développement des vacuoles, nous avons pu constater que ces petits

espaces clairs entourant les corpuscules métachromatiques n'étaient autre chose que l'origine des vacuoles; plus tard ils s'accroissent, se rejoignent et se fusionnent pour constituer des vacuoles nettement caractérisées.

Cependant, en dehors des vacuoles, il peut exister un certain nombre de ces granules dans le protoplasme et il semblerait plutôt que tous ces granules aient une origine protoplasmique. Ils paraîtraient se former dans les mailles du protoplasme limitant les vacuoles pour pénétrer dans ces vacuoles au fur et à mesure qu'elles se développent. Lorsque celles-ci se sont fusionnées pour constituer de grosses vacuoles, il subsiste toujours quelques restes de travées protoplasmiques, représentant le contour des vacuoles primitives et c'est précisément dans ces endroits ainsi que sur tout le pourtour de la vacuole, que se trouve localisé le plus grand nombre de granules.

Ces corpuscules métachromatiques sont très variables par leur forme et par leur dimension; les uns sont gros (environ 3, 5 μ de diamètre), ordinairement sphériques, quelquefois cependant à contour légèrement lobé; les autres, très petits et plus ou moins anguleux, sont réunis en masses confuses, ou présentent par leur disposition un aspect plus ou moins réticulé.

Si l'on examine un filament jeune coloré par l'hémalun, on est frappé de voir un protoplasme coloré en bleu pâle, contenant un assez grand nombre de petites vacuoles, se succédant quelquefois à intervalles à peu près réguliers (Pl. X, fig. 1 et 5); elles renferment ce contenu granulaire, dont les éléments offrent souvent l'aspect d'un fin réticulum et se colorent si intensivement, qu'au premier abord on serait tenté de prendre les vacuoles pour des noyaux vacuolaires constitués d'un nucléohyaloplasme incolore et d'un nombre considérable d'éléments chromatiques. Mais une décoloration prolongée ne laisse aucun doute sur leur nature extranucléaire, car elle fait apparaître dans le protoplasme les organes que nous avons décrits, qui présentent tous les caractères des noyaux, et que tous les auteurs qui ont étudié les champignons inférieurs considèrent comme tels. Au moment où naissent les conidies, la vacuole du filament la plus voisine du jeune bourgeon s'y introduit avec le protoplasme, en s'allongeant, puis en se rétrécissant dans le col qui sépare la nouvelle cellule du filament et se divise en deux vacuoles, dont l'une reste dans le filament et dont l'autre se trouve logée dans la conidie (Pl. X, fig. 12). En même temps les deux vacuoles ont gardé chacune une portion des granules contenus dans la vacuole primi-

tive. Les mêmes phénomènes se produisent dans le bourgeonnement des conidies levures et toujours la vacuole mère se divise en même temps que le noyau et laisse une part de son contenu aux deux vacuoles filles. Ces divisions de vacuoles, qui paraissent être suivies d'un partage de leur contenu, augmentent encore leur analogie avec des noyaux. Souvent aussi on trouve dans certains filaments un grand nombre de petites vacuoles contenant un seul corpuscule métachromatique, et présentant tout à fait l'aspect du noyau, ce qui complique beaucoup l'étude histologique de ces champignons et peut donner lieu à de graves erreurs.

Ces corpuscules sont, comme on l'a vu, de taille très variable, mais les plus gros d'entre eux sont le plus souvent entourés d'un très grand nombre de petits ; souvent même ceux-ci s'accolent intimement aux gros et masquent leur contour de telle sorte que ces derniers paraissent s'alimenter des petits et que les gros granules semblent être le résultat de leur fusion (Pl. X, fig. 17).

Dans les filaments plus âgés, le protoplasme n'est constitué que d'une mince zone périphérique entourant une ou plusieurs énormes vacuoles et ces vacuoles sont remplies d'une très grande quantité de granules qui alors deviennent tous sphériques et prennent des

dimensions considérables pouvant atteindre jusqu'à 5 μ (Pl. X, fig. 14, 15 et 16).

Les colorations de ces granules soit à l'hémalun, soit au bleu de méthylène, soit même dans certains cas à l'hématoxyline de Heidenhain, les montrent constitués d'une paroi qui prend énergiquement la couleur et d'un centre plus ou moins hyalin, qui reste beaucoup plus pâle. Quelquefois cette paroi est entr'ouverte à l'un de ses pôles et offre l'aspect d'un croissant.

Ces corpuscules métachromatiques possèdent une consistance solide; si on les écrase à l'aide d'une pression exercée sur la lamelle qui recouvre la préparation, ils ne se déforment généralement pas, mais se brisent.

Au moment de la dégénérescence, le protoplasme se transforme peu à peu en petites gouttelettes d'huile, les vacuoles disparaissent et les globules d'huile se fusionnent et constituent de grosses masses formées de la juxtaposition de deux ou trois globules occupant le centre de la cellule et entourées encore par quelques microsomes de protoplasme. Tout le reste de la cellule est occupé par un liquide cellulaire. Les corpuscules métachromatiques ont disparu en presque totalité, il en reste cependant encore quelques-uns dans le liquide cellulaire (Pl. I, fig. 27, 28, 29 et 30).

Nous avons provoqué ces phénomènes de

dégénérescence en plaçant un mycélium jeune et prospère dans de l'eau distillée. Au bout de quarante-huit heures, on ne trouvait dans les filaments que des débris de protoplasme et une grande quantité de globules d'huile. Les corpuscules métachromatiques avaient diminué de nombre et de taille, cependant il en subsistait une petite quantité dans la plupart des filaments ; dans quelques-uns ils avaient complètement disparu.

Beaucoup d'auteurs ont confondu ces corpuscules avec les globules d'huile, mais ils ne montrent aucun des caractères michrochimiques des corps gras.

Ils ne se dissolvent ni par l'éther ni par le chloroforme ; l'acide osmique ne les brunit pas.

Les globules d'huile provenant de la dégénérescence protoplasmique se colorent au contraire en brun foncé par l'acide osmique et se dissolvent par l'éther et le chloroforme. Ils se distinguent en outre de ces corpuscules par une moins forte réfringence et des contours moins réguliers. Enfin ils ne se colorent jamais par les colorants nucléaires (1). Une coloration à l'hémalun suivie d'un traitement par l'acide

(1) Matruchot a observé au contraire chez les Mortierellées des globules d'huile provenant de la dégénérescence protoplasmique, qui fixaient certaines matières colorantes produites par des bactéries chromogènes.

osmique permet de très bien différencier les globules d'huile, qui brunissent sous l'action de l'acide osmique, des corpuscules métachromatiques colorés en rouge par l'hémalun.

Par leur aspect souvent réticulé dans l'intérieur des vacuoles, par leur affinité pour les colorants du noyau, par les caractères qu'ils manifestent vis-à-vis des mélanges de fuchsine et de vert de méthyle et à bien d'autres égards, ces corpuscules paraissent correspondre aux granules nucléaires de Wager et nos observations ultérieures nous confirmeront dans cette idée.

Ces caractères les mettent en effet en parenté avec la chromatine, comme Wager et Eisenschitz l'ont pensé pour les levures. Cette hypothèse pourrait se soutenir chez les levures comme nous le verrons et dans les conidies levures de notre champignon : dans ces dernières en effet, les deux vacuoles polaires chargées de petits granules fortement colorables pourraient être considérées comme des noyaux; le véritable noyau se colore d'une manière beaucoup moins vive; très souvent il est voisin ou en contact direct de l'une de ces vacuoles, étant donnée l'étroitesse de la cellule, et comme il laisse difficilement apercevoir sa structure, il pourrait être assimilé à un nucléole. Mais lorsqu'on étudie les filaments mycéliens, que l'on y voit, dans les grosses vacuoles, ces corpuscules prendre

des tailles considérables, allant jusqu'à plus de 5 μ, et occuper, avec la vacuole, la presque totalité de la cellule, cette interprétation n'est plus admissible. D'autre part, les noyaux du mycélium, de taille supérieure, offrent une structure différenciée et sont très distinctement séparés des vacuoles, surtout dans les filaments jeunes. Cependant il paraît exister une relation entre les noyaux et les corpuscules métachromatiques et l'on voit souvent certains de ces corpuscules se grouper au voisinage du noyau et l'entourer, mais ce rapport entre ces deux corps très distincts doit être attribué à une autre cause, ainsi que nous le montrerons dans la suite.

Enfin, ces corpuscules ne possèdent aucune des réactions michrochimiques de la nucléine. Les dissolvants de la nucléine indiqués par Zacharias les laissent intacts, ils résistent aux solutions de potasse caustique à 10 p. 100, aux solutions concentrées de carbonate de soude, aux solutions d'acide chlorhydrique à quatre parties d'acide pour trois d'eau après vingt-quatre heures de traitement, mais ils perdent la propriété de se colorer et ne la recouvrent souvent même pas après un lavage prolongé. Cela nous permettra de comprendre dans la suite comment chez des organismes plus petits que les levures, où ces corpuscules s'aperçoivent

plus difficilement à l'état frais, ils peuvent paraître solubles dans ces diverses substances.

Leur résistance vis-à-vis des dissolvants de la nucléine, de même que le caractère très spécial de leur coloration qui est un des plus beaux exemples de métachromasie et dont nous étudierons plus tard la signification, nous les ont fait assimiler à des corps qu'on trouve chez beaucoup de bactéries. Babès, qui les a étudiés un des premiers, leur donne le nom de *corpuscules métachromatiques,* hésitant à leur donner la signification de véritables noyaux. Ernst leur attribuant un rôle considérable dans la formation des spores les désigne sous le nom de *grains sporogènes.* Enfin Bütschli les étudie sous le nom de *grains rouges* et les distingue nettement de la chromatine. Le nom de grains rouges semble avoir prévalu. Les deux désignations de corpuscules métachromatiques et de grains rouges sont correctes, mais nous avons adopté la première en raison de sa priorité. Ces corpuscules ont fait l'objet d'innombrables controverses qui sont loin d'être résolues et que nous essayerons d'éclaircir au cours de notre étude.

Ces corps ont le caractère essentiel de se colorer toujours en rouge avec presque toutes les matières colorantes et de fixer le bleu de méthylène à l'état vivant. Nous examinerons

dans un chapitre spécial ce que l'on doit penser de leur nature et nous renvoyons à cet endroit la discussion des nombreux travaux auxquels ils ont donné lieu. Certains observateurs les avaient déjà signalés chez quelques champignons, mais aucune observation précise n'a été faite jusqu'ici sur la présence et le rôle de ces corps chez les champignons : c'est cependant là bien plus que chez les bactéries qu'on aurait pu obtenir les résultats les plus précis, étant donnée la grosseur relative qu'ils y atteignent.

Cependant, Maire les a décrits chez l'*Ustilago maydis*; il les sépare nettement des globules d'huile et les différencie des noyaux. Il les considère comme des corps extravacuolaires et entourés d'une zone hyaloplasmique ; ce serait pour cet observateur des produits de rebut.

Le rôle paraît difficile à trancher. On ne peut guère admettre cette dernière opinion, puisqu'ils sont liés au maximum de vitalité du champignon et qu'ils sont d'autant plus nombreux que celui-ci est plus jeune et placé dans des conditions plus favorables, mais au contraire le fait qu'ils participent au bourgeonnement et qu'ils disparaissent en presque totalité au cours de la dégénérescence nous donne à penser que ce sont des produits de réserve.

Résumé. — Il existe donc chez ce champignon un prôtoplasme qui, d'abord dense et homogène, se creuse peu à peu de vacuoles qui, par leur fusion, finissent par occuper la majeure partie des articles.

Ces vacuoles renferment une quantité considérable de globules réfringents, ordinairement animés de mouvements browniens, qui pénètrent avec elles dans les jeunes bourgeons et sont en rapport avec le maximum de vitalité du champignon. Ces corps, qui jusqu'alors n'avaient pas attiré l'attention des mycologues, possèdent une forte électivité pour les matières colorantes avec lesquelles ils prennent souvent une teinte rouge ; nous les avons assimilés aux grains de chromatine de Wager, mais contrairement à l'opinion de cet auteur, ils n'ont aucun caractère nucléaire et doivent être identifiés aux *corpuscules métachromatiques de Babès* (*grains rouges de Bütschli*).

A la fin du développement apparaissent des phénomènes de dégénérescence du protoplasme, qui se transforme en globules d'huile que l'on ne doit pas confondre avec les corpuscules métachromatiques.

On remarque en outre des *noyaux* très nettement définis, d'une structure très simple. Ces noyaux se divisent par un procédé qui paraît être voisin de l'*amitose*.

Dans les formes levures, on observe deux vacuoles polaires chargées de corpuscules métachromatiques et un seul noyau situé au centre de la cellule. Cette structure des formes levures de *Dematium*, qui n'avait pas été étudiée jusqu'alors, est absolument conforme à celle que nous constaterons chez les levures.

II. — Oidium lactis (Fresenius)

Caractères morphologiques. — L'*O. lactis* connu depuis longtemps a d'abord été considéré comme très polymorphe. Un grand nombre de recherches furent faites dans ce sens (Cienkowski, Billroth, Haberlandt, Brefeld) ; le premier de ces observateurs rattache l'*O. lactis* au *Chalara mycoderma* et peut-être aussi au *S. mycoderma vini.*

Billroth prétend que les conidies sont capables de développer une forme semblable aux Saccharomyces ; Haberlandt croit découvrir dans cette espèce la formation de sporanges.

Brefeld considère l'*O. lactis* comme une forme isolée appartenant aux organismes inférieurs et peut-être une de celles dont on suppose que les formes supérieures se sont développées.

Hansen reprit l'étude de cette moisissure et démontra son indépendance du *Chalara mycoderma* et du *S. mycoderma*. Enfin il ne put jamais obtenir les sporanges décrits par Haberlandt.

Nous l'avons trouvée sur des fromages de Neuchâtel, que nous avions laissés fermenter pendant quelques jours sous cloche et où elle formait un léger duvet blanchâtre recouvrant entièrement le substratum, et nous l'avons étudiée dans un travail antérieur.

Cette moisissure présente les caractères suivants : le thalle est cloisonné; les cloisons sont réparties d'une manière irrégulière; leur nombre diminue à mesure que l'on se rapproche des extrémités. Chaque filament fournit un certain nombre de branches latérales, chacune d'elles naissant immédiatement au-dessous d'une cloison; elles ne se développent généralement que sur un seul côté.

Les spores ne naissent que lorsque l'accroissement est terminé. A ce moment les extrémités des filaments se cloisonnent abondamment et chacun des articles nouvellement formés se détache pour donner une spore. Enfin, ces spores ne se produisent pas seulement aux extrémités, mais on en voit en même temps se former un grand nombre au milieu même des filaments par le même procédé, par simple

dissociation des articles : les cloisons se rapprochent à différents endroits d'un filament, pour fournir autant de spores qui se détachent à mesure. Le mycelium se divise ; et dans les cultures âgées, on ne distingue plus que des débris épars du mycélium entremêlés à un nombre considérable de spores. En somme, chacune de ces spores doit être considérée comme résultant d'une simple fragmentation du mycélium. Il n'y a pas à proprement parler de véritable fructification.

Il arrive le plus souvent que les spores ainsi formées continuent à se développer dans le milieu où elles sont nées. Elles s'allongent dans un sens quelconque, se cloisonnent et se fragmentent de nouveau, à la façon des Schizosaccharomyces ; cependant il existe aussi des formes très irrégulières, arrondies, qui paraissent être dues à un mode intermédiaire entre le bourgeonnement et la segmentation. On comprend donc que ces spores soient de taille essentiellement variable. Leur dimension oscille entre 15×7 et 31×7 μ. Leur forme est également peu constante. Le plus souvent elles sont rectangulaires, c'est du moins la forme typique, mais d'autres peuvent être ovales, cubiques et même sphériques.

Les spores germent d'ordinaire en produisant un tube germinatif généralement placé à l'une

de leurs extrémités et dirigé perpendiculairement ou obliquement par rapport à leur axe, donnant des figures qui rappellent la forme d'un marteau.

Dans les milieux très favorables à sa nutrition, l'*O. lactis* donne lieu à des formes allongées, avec mycélium touffu très ramifié et fructification tardive. Au contraire dans les milieux défavorables, les spores émettent souvent des tubes germinatifs, qui, au lieu de produire un mycélium, se dissocient immédiatement pour former un chapelet de spores, et les spores nouvellement formées peuvent à leur tour se multiplier par allongement dans différents sens et formation de cloisons médianes, produisant ainsi une série de formes levures morphologiquement très voisines du *Sch. pombe* et que nous proposons de désigner sous le nom de *formes Schizosaccharomyces*.

Protoplasme. — Dans les cultures sur tranches de carotte, le protoplasme est d'abord très dense et homogène ; il est creusé de très petites vacuoles contenant quelques *corpuscules métachromatiques*. Ces vacuoles se multiplient, augmentent de volume, et le protoplasme tout entier se trouve rempli d'un très grand nombre de vacuoles très rapprochées les unes des autres qui lui donnent un aspect alvéolaire. Au fur et à

mesure que les filaments se développent, les vacuoles se fusionnent les unes aux autres pour constituer d'énormes vacuoles remplissant la plus grande partie des articles. Le protoplasme est alors réduit à une mince couche pariétale; plus tard il présente des phénomènes de dégénérescence et se transforme en globules d'huile.

Les corpuscules métachromatiques sont toujours en petites quantités dans l'*O. lactis*, et n'atteignent jamais de grandes dimensions (Pl. II, fig. 8 et 10).

En revanche le glycogène existe en très grande abondance dans ce champignon. Il apparaît ordinairement sous forme de petits granules très nombreux, qui naissent dans le protoplasme tout près des vacuoles; quelquefois il imprègne tout le protoplasme. Lorsque les vacuoles se sont fusionnées, il pénètre dans leur intérieur et les remplit. Le traitement par l'iodo-iodure de Gram donne alors aux vacuoles une teinte d'un brun acajou. Souvent une partie de ce glycogène paraît rester insoluble et l'on remarque fréquemment, dans des vacuoles pas du tout ou très faiblement colorées en brun acajou, des globules de forme variable, quelquefois très gros, qui montrent au contraire d'une manière très nette la réaction du glycogène. En examinant le champignon à l'état frais, on aperçoit fréquemment dans les

vacuoles des globules qui se distinguent très difficilement et qui présentent un peu l'aspect des globules d'huile, mais s'en différencient facilement par leur très faible réfrigence. Si l'on place un morceau de mycélium dans une goutte d'eau et sous une lamelle et qu'on observe au microscope en introduisant graduellement sur le bord de la préparation, à l'aide d'une pipette, quelques gouttes d'une solution très diluée d'iodo-iodure de potassium, on voit ces globules donner progressivement la réaction du glycogène. Ce glycogène semble persister pendant très longtemps dans les vacuoles, et ne disparaît que partiellement dans les vieilles cellules.

Dans les milieux liquides, tels que le liquide Raulin, où l'on remarque un développement très semblable, le glycogène est au contraire en très petite quantité dans les vacuoles et paraît disparaître très rapidement au moment de la pleine multiplication du champignon.

Dans les milieux peu nutritifs, on observe des phénomènes de dégénérescence très précoces. Les filaments se vident et la plus grande partie du protoplasme se transforme en globules d'huile. Dans certains endroits où le protoplasme était le plus abondant, la multiplication peut encore se continuer pendant quelque temps; on voit se rassembler quelques

corpuscules métachromatiques et une petite quantité de glycogène, puis il se produit des cloisons transversales qui peuvent délimiter quelque spores. Il est curieux de voir que ce sont ces parties qui contiennent le plus de globules d'huile et que les spores formées dans ces conditions renferment une forte proportion de résidus de la dégénérescence protoplasmique. Aussi peut-on se demander si ces globules d'huile, qui chez le *D. species* sont inconstestablement des produits de dégénérescence, ne représenteraient pas chez l'*O. lactis* des matières de réserve. Remarquons cependant qu'ils apparaissent d'autant plus vite que le milieu où se trouve le champignon est plus impropre à l'alimentation ; d'autre part, au moment de la germination, ils paraissent subsister, et restent localisés dans la spore sans être assimilés ; aussi y a-t-il peut-être plus de raisons pour les considérer comme des produits de dégénérescence. Le fait que les spores se forment dans les endroits qui contiennent ces globules s'explique en effet si l'on envisage que ce sont les seules parties qui renfermaient du protoplasme, le reste étant occupé par les vacuoles, et que si ce protoplasme s'est transformé pour une large part en huile, il en reste cependant une partie active.

Noyaux. — Les noyaux sont constitués d'un *chromoblaste* entouré d'une *aréole claire*, dont il est souvent difficile d'apercevoir la membrane limitante. Cependant dans les filaments un peu âgés où le protoplasme est moins abondant et laisse plus facilement distinguer les noyaux, ils ressortent très nettement avec leur membrane et montrent alors une structure analogue à celle des noyaux du *D. species* (Pl. XI, fig. de 1 à 7, fig. 9 et de 11 à 19). Leur diamètre atteint environ 1 μ.

Le nombre des noyaux est très variable; chaque article en contient de treize à vingt, mais ils peuvent être beaucoup plus nombreux surtout aux extrémités des filaments où ils atteignent facilement le chiffre de trente ou quarante.

La division des noyaux s'observe surtout aux extrémités des filaments, c'est-à-dire dans la région d'accroissement, tandis qu'il est rare de la rencontrer dans les autres parties du mycélium. Sur les filaments en voie de croissance, les noyaux restent toujours localisés un peu au-dessous de la région terminale qui contient un protoplasme très épais retenant fortement les matières colorantes. Les noyaux s'y divisent activement et s'avancent à l'extrémité des filaments au fur et à mesure que celle-ci s'accroît, restant toujours ainsi dans la région subterminale.

Le même phénomène se produit pour la formation des bourgeons latéraux. On voit d'abord apparaître un petit prolongement rempli de protoplasme à la base duquel les noyaux se divisent pour ne s'y introduire que lorsqu'ils auront atteint une certaine longueur.

La division s'effectue par un processus analogue à celui que nous avons étudié chez le *D. species*. Elle se manifeste par les phases suivantes : à certains endroits on remarque le noyau constitué de deux masses accolées l'une à l'autre et réunies dans une même aréole; dans d'autres figures, il apparaît comme formé de deux parties distinctement séparées, mais toujours enveloppées par une même aréole. Enfin, on observe fréquemment des noyaux disposés par paires et très rapprochés l'un de l'autre, provenant sans doute d'une bipartition récente.

Les spores contiennent de un à trois noyaux, le nombre le plus fréquent est de quatre ou cinq.

Les spores naissent simplement par un cloisonnement abondant sans que le noyau paraisse jouer un rôle important dans leur formation. On le voit ordinairement se diviser dans la région terminale avant la formation des spores, puis les cloisons se forment et les spores peuvent se détacher du mycélium ou bien elles fournissent chacune une ou plusieurs cloisons nouvelles et dans ce cas les noyaux peuvent

continuer leur division dans l'intérieur même de la spore de façon à maintenir leur nombre à peu près égal dans les spores filles (Pl. II, fig. 13).

Les spores appartiennent donc à cette catégorie que Dangeard désigne sous le nom d'*oïdies* et qui se caractérisent par leur mode de formation qui se produit simplement par une fragmentation du mycélium et par leur structure toujours plurinucléée (Pl. II, fig. 9, 11, 12 et 14).

C'est également par un procédé analogue que les spores se développent soit pour former des oïdies secondaires (*formes Schizosaccharomyces*), soit pour germer définitivement en produisant un tube germinatif : les oïdies contiennent un nombre variable de noyaux : un moment avant de se cloisonner, quelques-uns de ces noyaux commencent à se diviser, puis on voit se former une membrane qui sépare la cellule en deux cellules filles (Pl. II, fig. 15, 16, 17, 18, 19).

Résumé. — Ainsi, on observe chez ce champignon une structure très voisine de celle du précédent. L'*O. lactis* ne se distingue guère du *D. species* que par le peu de corpuscules métachromatiques renfermés dans ses vacuoles.

Par contre, le glycogène, exceptionnel chez

le *D. species*, est ici très abondant. Il naît d'abord sous forme de granules très près des vacuoles et se déverse ensuite dans ces vacuoles.

Dans les formes levures qui morphologiquement sont très voisines du *Sch. pombe*, il existe une structure plurinucléée qui les distingue histologiquement des cellules du Sch. pombe qui, comme nous le verrons, ne contiennent qu'un seul noyau (1).

(1) M. Duclaux considère l'*O. lactis* comme très ressemblant au Sch. pombe et comme par exemple étant à *Sch. pombe* ce que le mycoderme du vin est à la levure de bière (*Traité de microbiologie*, t. III, p. 639). En réalité, il n'existe entre *l'O. lactis* et le *Sch. pombe* qu'une ressemblance superficielle.

CHAPITRE III

Saccharomyces cerevisiæ I (Hansen)

1. — Caractères généraux

Cette levure de fermentation haute, a été isolée par Hansen dans les brasseries d'Édimbourg. C'est une levure à cellules grosses, rondes ou ovales, très rarement allongées. Les cellules donnent 1 à 4 spores dont le diamètre varie de 3, 5 à 9 μ. Les voiles de ce Saccharomyces possèdent des cellules peu allongées, parfois en forme de boudins.

Aspect à l'état frais. — A l'état frais, le *S. cerevisiæ* offre, au commencement de son développement, un protoplasme très dense et

homogène, dans lequel on aperçoit un certain nombre de petites vacuoles contenant une quantité variable de *granules réfringents* et animés de mouvements browniens, analogues à ceux que nous avons remarqués dans le *D. species*. A côté de ces vacuoles, on distingue quelquefois une petite masse plus ou moins hyaline, limitée par une membrane épaisse et légèrement réfringente, qui représente le *noyau*.

Action des matières colorantes. — En colorant les cellules par l'iodo-iodure de Gram, on remarque un protoplasme coloré en jaune avec parfois quelques taches de glycogène qui prennent une teinte brun acajou. Les granules se teignent en jaune pâle et le noyau présente un aspect brillant.

Le bleu de méthylène colore les granules soit en bleu intense, soit en violet, ou même en rouge et le protoplasme en bleu pâle, ordinairement sans laisser distinguer le noyau. (Pl. X, fig. de 31 à 49).

La safranine donne au noyau une coloration rouge, et teint le protoplasme en rose pâle ; les granules se différencient en rouge foncé.

Le vert de méthyle colore le protoplasme en vert pâle et le noyau en vert un peu plus foncé ; les granules apparaissent avec une

nuance qui varie du vert foncé au bleu intense souvent violacé.

Le violet de gentiane laisse apercevoir le noyau en violet sombre, le protoplasme en violet pâle et colore les granules en rouge.

Les mélanges de fuchsine et de vert de méthyle suivant la méthode de Wager colorent le protoplasme et les noyaux en violet et les granules en vert ou bleu intense, comme les grains de chromatine de Wager.

Avec l'hémalun, on obtient une coloration bleu pâle du protoplasme, le noyau se dessine en bleu un peu plus foncé que le protoplasme et les granules se distinguent dans les vacuoles par leur couleur rouge sombre (Pl. X, fig. de 1 à 30).

L'hématoxyline au fer donne de très belles colorations du noyau ; le protoplasme se décolore complètement par l'alun de fer, ainsi que les granules. Accidentellement les granules restent colorés et le noyau ne se différencie pas ou peu.

L'action de ces différents colorants nous montre donc chez le *S. cerevisiæ* une structure très semblable à celle que nous avons décrite chez les deux moisissures que nous venons d'étudier et l'on distingue ici encore *un noyau*, qui se colore en bleu mat par l'hémalun et une ou plusieurs vacuoles renfermant des *corpus-*

cules métachromatiques, lesquels se comportent comme les *grains de chromatine* de Wager avec lesquels on doit les identifier, mais qui sont indépendants du noyau.

II. — Développement végétatif

Étudions de plus près la structure de cette levure en suivant son développement dans le liquide de Mayer.

DÉBUT DE LA FERMENTATION

a) *Protoplasme*. — Dans les premières heures de la fermentation, le protoplasme se colore à peu près uniformément avec les matières colorantes : il est plus ou moins homogène ; il présente cependant un aspect légèrement granuleux, mais sans aucune structure appréciable. On aperçoit à l'intérieur de la cellule une ou plusieurs très petites vacuoles contenant quelques corpuscules métachromatiques. Ces corpuscules, d'abord en très petite quantité, augmentent au fur et à mesure que le développement s'effectue.

b) *Noyau*. — Le noyau se trouve ordinairement au milieu de la cellule et contre la vacuole ;

très souvent, lorsqu'il existe plusieurs vacuoles, il est entouré par un cercle de petites vacuoles et paraît constituer avec elles un seul organe. Il peut arriver cependant qu'il soit distinctement séparé de la vacuole. Ce noyau se différencie par l'hémalun ou par l'hématoxyline de Bœhmer qui lui donnent une coloration d'un bleu mat, légèrement plus sombre que le protoplasme. Suivant le degré de décoloration, il apparaît comme une masse sphérique et uniformément colorée, ou comme un organe vésiculeux, limité par une membrane et laissant apercevoir dans son intérieur un ou plusieurs granules. A ce stade, il est ordinairement visible même à l'état frais, et avec toutes les matières colorantes. L'iodo-iodure de potassium, le vert de méthyle, la safranine, le rouge de Magenta, le violet de gentiane, la fuchsine sont capables de le différencier ; ils le colorent uniformément sans laisser distinguer de structure. Mais les meilleurs résultats sont obtenus par l'hématoxyline au fer. Le noyau se montre sous forme d'un corps sphérique assez gros, atteignant souvent un diamètre de 1, 7 à 2 μ, constitué d'un *nucléohyaloplasme* incolore entouré d'une *membrane* fortement colorée (Pl. II, fig. de 20 à 40 et Pl. III, fig. de 1 à 15). Dans les cas les plus favorables, on distingue dans ce nucléohyalo-

plasme un certain nombre d'*éléments chromatiques* disposés d'une façon très variable, soit accolés à la membrane, soit sous forme de deux ou trois grosses masses, soit enfin sous l'aspect de petits filets, quelquefois disposés en rayons autour du centre du noyau. On remarque très souvent un granule un peu plus gros que les autres, généralement placé contre la membrane, quelquefois au centre du noyau et qui semble représenter un *nucléole*. Dans quelques cas, le noyau très pauvre en chromatine ne laisse apercevoir que ce nucléole (Pl. II, fig. 34 et Pl. III, fig. 13); parfois même on ne distingue que la membrane qui seule fixe la couleur. Ce noyau ressemble beaucoup par sa forme et sa dimension aux noyaux que nous avons observés chez le *D. species*, mais la chromatine au lieu d'être réunie en un unique chromoblaste se trouve disséminée dans le nucléoplasme. Il n'y a donc aucun doute sur l'existence du noyau et l'on peut considérer le noyau du *S. cerevisiæ* comme un noyau typique se rapprochant de celui qu'on observe chez les Ascomycètes supérieurs et chez les Basidomycètes.

MILIEU ET FIN DE LA FERMENTATION

a) *Corpuscules métachromatiques*. — Peu à peu, les vacuoles augmentent de nombre et de

dimension, en même temps que les corpuscules métachromatiques deviennent plus abondants et grossissent, prenant la forme de sphérules, laissant apercevoir une paroi fortement colorée et un centre plus pâle. Quelquefois, la cellule tout entière se trouve remplie de vacuoles, séparées par des mailles très fines de protoplasme et cette disposition rappelle les structures alvéolaires décrites par Bütschli chez les bactéries (Pl. X, fig. 36 et 37). Le noyau se trouve alors comprimé et masqué par les vacuoles et il est plus difficile à différencier. Mais ordinairement les vacuoles sont beaucoup moins développées et n'occupent qu'une partie de la cellule. Dans quelques cas, il n'existe qu'un seul gros corpuscule, dans chacune des vacuoles; dans d'autres, on en observe une grande quantité disséminés dans les vacuoles, et qui quelquefois offrent par leurs groupements l'aspect d'un fin réticulum.

Lorsqu'il n'existe qu'une seule ou deux ou trois petites vacuoles situées au voisinage du noyau, et que les granules métachromatiques présentent cet aspect réticulé, on pourrait croire que ces vacuoles représentent le noyau et que les granules métachromatiques constituent le réseau de chromatine de ce noyau : cette erreur est d'autant plus facile à commettre que le noyau se différencie difficilement et se

colore d'une manière beaucoup plus pâle que des corpuscules métachromatiques (Pl. X, fig. 5, 11, 8, 18, 19, 21, 22). Aussi s'explique-t-on aisément les interprétations de certains auteurs (Eisenschitz, Roncali, Wager).

Au bout de quelque temps, les vacuoles se fusionnent d'ordinaire en une seule grosse vacuole, qui occupe une grande partie de la cellule. Lorsque la vacuole est volumineuse, le protoplasme se trouve comprimé contre la paroi et le noyau un peu moins plastique peut faire saillie à l'intérieur de la vacuole. Il arrive aussi que le noyau se trouve au-dessus de la vacuole par rapport à l'objectif et paraisse logé dans l'intérieur de la vacuole (Pl. III, fig. 7 et le Pl. X, fig. 20).

Au cours du développement le noyau s'entoure très souvent d'une certaine quantité de corpuscules métachromatiques qui le relient à la vacuole (Pl. X, fig. 17, 23, 24, 25). Ils sont souvent en assez grand nombre pour masquer le noyau, qui alors se différencie très difficilement et certains colorants tels que l'hématoxyline de Heidenhain le représentent avec une forme irrégulière, étoilée et très ressemblante à certaines figures de Bouin. Au contraire l'hémalun, lorsque la décoloration a été soigneusement faite, permet de distinguer le noyau, qui se colore en bleu, des granules qui

le recouvrent et qui prennent une teinte rouge sombre. Cette disposition a été mal interprétée par Mœller, qui considère le noyau des levures comme capable de se déformer et susceptible de mouvements amiboïdes et par Bouin qui estime qu'au moment de la fermentation, le noyau prend une forme irrégulière et qu'une partie de la chromatine peut se disséminer à l'intérieur du protoplasme afin d'augmenter la surface de contact entre le protoplasme et le noyau.

Au contraire Wager a différencié ces deux éléments et comme nous considère les granules qui entourent son *nucléole*, qui pour lui sont distincts de ceux que contiennent les vacuoles, comme des produits de réserve utilisés peut-être à la nutrition du *nucléole*.

Pour Wager, il existerait donc deux catégories de granules, les uns seraient localisés dans les vacuoles et seraient de nature chromatique, constituant le noyau avec l'organe que nous avons considéré comme tel et qui pour lui représente le nucléole. Les autres seraient disséminés dans le protoplasme et souvent autour du noyau et correspondraient aux granules d'Hieronymus. Il ignore la nature chimique de ces derniers, mais le fait que certains d'entre eux se colorent par la teinture d'alkana lui font croire que ce seraient des

gouttelettes d'huile, les autres seraient des grains de protéine.

Les colorations dont se servait Wager, comme nous l'avons déjà indiqué, ne donnaient pas à ces corps leur couleur rouge spécifique et n'étaient pas suffisantes pour identifier ces deux qualités de granules. Au contraire les colorations à l'hémalun indiquent manifestement qu'ils sont de même nature et on en atteint la conviction lorsqu'on emploie le bleu de méthylène avec lequel la métachromasie de ces granules est un fait exceptionnel.

b) *Glycogène.* — Environ vingt-quatre heures après le début de la fermentation, le glycogène, qui jusque-là était resté localisé en petite quantité dans le protoplasme, devient très abondant et on voit se former dans la cellule un certain nombre de petites vacuoles, où il vient se déverser. Ces vacuoles ne tardent pas à se fusionner en une unique vacuole, qui prend alors des dimensions considérables, occupant presque toute la cellule, qui se transforme bientôt en une véritable glande à glycogène (Pl. X, fig. de 28 à 30 et de 38 à 44). La vacuole ou les vacuoles primitives, qui contenaient les corpuscules métachromatiques, se contractent et finissent peu à peu par disparaître complètement, et le noyau et les corpuscules métachro-

matiques, qui étaient renfermés dans ces vacuoles, se trouvent refoulés sur l'un des côtés de la cellule. C'est ce que Wager remarque en distingnant deux sortes de vacuoles, les unes qu'il désigne sous le nom de *vacuoles nucléaires* (vacuoles à corpuscules métachromatiques) et les autres qu'il appelle, par opposition, *vacuoles glycogéniques.* Il existe donc une spécialisation dans les substances contenues dans l'intérieur des vacuoles, que nous retrouverons chez la plupart des levures. Le glycogène ne pénétrant pas ou très peu dans les vacuoles à corpuscules métachromatiques, cette structure est très délicate à observer; il faut pour s'en rendre compte employer des solutions de Gram très diluées, qui colorent faiblement le glycogène et permettent de voir le contour des vacuoles.

Une méthode indiquée par Wager et consistant à colorer les cellules par le vert de méthyle et à les traiter ensuite par l'iodo-iodure de Gram donne de très intéressantes préparations, qui malheureusement ne se conservent que quelques instants, dans lesquelles le protoplasme se trouve coloré en vert jaunâtre, les granules en brun intense, et les vacuoles glycogéniques en brun acajou.

Les vacuoles remplies de glycogène prennent vis-à-vis des matières colorantes un caractère

différent de celui que possèdent les vacuoles à corpuscules métachromatiques. Tandis que les vacuoles à corpuscules métachromatiques se détachent incolores comme des taches très claires, possédant un certain relief, les vacuoles glycogéniques se distinguent avec moins de netteté du protoplasme et certaines matières colorantes, telles que le violet de gentiane, le vert de méthyle, le bleu de méthylène, l'hémalun, l'hématoxyline de Heidenhain, leur donnent une teinte diffuse. De plus ces matières colorantes laissent souvent remarquer à l'intérieur de ces vacuoles de petits granules légèrement colorés, dont nous ignorons la nature; peut-être pourraient-il représenter des éléments non dissous du glycogène. On n'a cependant jamais remarqué jusqu'alors que le glycogène soit capable de fixer les colorants (Pl. III, fig. de 16 à 20 et Pl. X, fig. 45 et 46). Les caractères de ces vacuoles glycogéniques se laissent même apercevoir à l'état frais où elles présentent un aspect un peu réfringent et très différent des vacuoles à corpuscules métachromatiques.

A ce stade le noyau se distingue encore facilement, mais il montre une tendance à se colorer uniformément et il est difficile d'apercevoir sa structure.

Wager n'a pas suivi le développement plus longtemps, aussi avons-nous jugé utile de

rechercher les modifications produites dans la cellule à la fin de la fermentation.

Cette structure se conserve pendant toute la période active de la fermentation ; mais dès que les phénomènes commencent à se ralentir, le glycogène disparaît graduellement et la vacuole qui le contenait diminue peu à peu, tandis que le protoplasme qui occupait la partie périphérique de la cellule se gonfle progressivement. Une ou plusieurs nouvelles vacuoles se reforment dans le protoplasme et les corpuscules métachromatiques s'y localisent. Petit à petit la vacuole glycogénique, pressée par cette augmentation du protoplasme, se trouve déjetée sur un des côtés de la cellule, prenant l'aspect d'un ménisque concave, puis finit par disparaître en presque totalité. Finalement les cellules reprennent leur structure primitive, formée alors d'une vacuole centrale à contenu très hyalin dans laquelle se meuvent quelques corpuscules métachromatiques, ceux-ci ayant notablement diminué (Pl. X, fig. 47, 48 et 49).

c) *Dégénérescence.* — Les cellules peuvent se maintenir longtemps dans cet état, mais le plus souvent on observe au bout de quelque temps des phénomènes de dégénérescence. Peu à peu le protoplasme se contracte en forme de boules qui se séparent de la membrane et subit une

dégénérescence graisseuse. Les cellules finissent par être constituées presque uniquement de gros *globules d'huile*, occupant le milieu de la cellule et d'un liquide cellulaire contenant quelques restes de corpuscules métachromatiques et souvent même une petite quantité de glycogène. Il n'existe plus que très peu de protoplasme.

Ces globules d'huile possèdent les mêmes propriétés que ceux que nous avons rencontrés dans les champignons précédents. Ils brunissent par l'acide osmique et se dissolvent par l'éther et le chloroforme. Enfin ils ne fixent pas les matières colorantes et offrent une moins forte réfringence que les corpuscules métachromatiques.

Ce développement dépend du milieu dans lequel sont placées les levures, cependant il suit presque toujours une marche analogue, et la structure ne présente que des différences de détail. La fermentation ne paraît donc pas avoir d'action marquée sur la structure de la cellule.

Bourgeonnement. — Les bourgeons apparaissent sous forme de petites proéminences qui grossissent, se pédicellisent et se détachent de la cellule mère, lorsque celle-ci a atteint une taille suffisante. Dès le début de la formation d'un bourgeon, la vacuole de la cellule mère

produit un petit diverticulum qui s'introduit par le pédicelle avec une partie des corpuscules métachromatiques, pénètre dans le jeune bourgeon, puis se sépare de la vacuole primitive en gardant une part des corpuscules métachromatiques (Pl. X, fig. 15', 18). Ce partage de la vacuole précède ordinairement la division du noyau, qui le plus souvent ne subit aucune modification dans les premières phases de la formation du bourgeon.

Ce n'est généralement que lorsque la vacuole s'est introduite dans le bourgeon et souvent même lorsque son partage est terminé, que le noyau commence à se diviser. Il n'existe donc aucun rapport essentiel entre le noyau et la vacuole, contrairement à ce que pensait Wager. Cependant il arrive quelquefois que ces deux divisions de la vacuole et du noyau soient simultanées et que le noyau pénètre dans les jeunes bourgeons en même temps que la vacuole, mais le fait n'a aucune signification histologique.

La position du noyau paraît, comme pour les formes levures du *D. species*, absolument indépendante de la situation du bourgeon.

Souvent le noyau ne change pas de place : s'il se trouve à l'extrémité de la cellule opposée au bourgeon, il s'allonge et envoie un diverticulum très mince, qui traverse la cellule et va

rejoindre le bourgeon. Arrivé près de l'orifice du bourgeon, ce diverticulum se renfle à son extrémité, formant un haltère; les deux renflements ainsi formés restent quelque temps attachés par leur fil d'union (1) qui s'étire de plus en plus, et qui finit par se rompre, donnant ainsi un nouveau noyau destiné au bourgeon. Une fois détaché, ce noyau s'effile, s'introduit dans le col, puis pénètre dans le bourgeon, où il prend sa forme normale et va se placer à côté de la vacuole. Il est difficile d'apercevoir pendant cette division ce qui se produit dans l'intérieur de ce noyau, qui se colore uniformément; on remarque cependant dans quelques cas une partie médiane un peu plus sombre que le reste.

Parfois les noyaux laissent pendant un certain temps des traces du fil médian, suivant lequel ils sont divisés, et paraissent munis d'une queue; cette particularité constatée par plusieurs observateurs (Buscalioni, Brouin, Maire), résulte simplement d'un reste de l'allongement qu'a subi le noyau pendant sa division et disparaît dès que celui-ci a repris sa forme normale.

Si au contraire le noyau est situé tout près

(1) Ce fil d'union a été comparé par Buscalioni, et Maire au *Mittelstück* que Berthod a signalé chez certaines algues.

du bourgeon, il s'y introduit très simplement en s'allongeant et en se séparant à la naissance du col qui unit le jeune bourgeon à la cellule mère.

Quelquefois aussi, le noyau, au lieu de s'allonger pour rejoindre le bourgeon, se divise sur place : il s'étire très légèrement, se rétrécit un peu à sa partie médiane et se partage aussitôt par la formation d'une cloison médiane. On observe alors deux noyaux à côté l'un de l'autre, dont l'un ne tarde pas à émigrer dans le bourgeon.

Ces divisions rentrent sans aucun doute dans la catégorie des *amitoses typiques* (Pl. II, fig. 22 et 40; Pl. III, fig. 1, 2, 4, 5, 9, 12, 14 et 20; et Pl. X, fig. 3, 6 et fig. de 10 à 14).

Critique des travaux antérieurs. — Avant de poursuivre plus loin le développement de cette levure, nous essaierons de comparer nos résultats à ceux auxquels sont arrivés les nombreux observateurs qui ont étudié cette même question.

L'organe que nous avons considéré comme noyau correspond à celui qu'ont successivement décrit Schmitz, Hansen, Zalewsky, Zacharias, Strasburger, Kunstler, Mœller, Dangeard, Henneguy, Crato, Buscalioni, Bouin, et au nucléole de Wager.

Dangeard et Henneguy observent un noyau constitué d'un nucléole et d'une aréole claire limitée par une membrane. Bouin le décrit au contraire comme formé d'un nucléohyaloplasme contenant un certain nombre de granules chromatiques et limité par une membrane. La structure que nous avons signalée correspond à peu près à celle de Bouin avec plus de netteté. Nous y distinguons en effet un nucléohyaloplasme limité par une membrane et renfermant un nucléole et quelques éléments chromatiques.

Dans certains cas, on colore seulement le nucléole, les granules chromatiques n'apparaissent pas et on s'explique ainsi la structure figurée par Dangeard dans le *S. cerevisiæ*. Nous verrons d'ailleurs qu'il existe un grand nombre de levures dont le noyau laisse apercevoir uniquement un nucléoplasme et un chromoblaste. Quelquefois enfin, lorsque la décoloration a été insuffisante, tout le noyau conserve une teinte uniforme ; ou même, il peut arriver, soit que la fixation ait été défectueuse et ait provoqué une contraction du noyau, soit que la décoloration ait été exagérée, qu'il ne montre que son nucléole ; on obtient ainsi les noyaux homogènes de Buscalioni et les nucléoles de Wager.

Au contraire Janssens et Leblanc paraissent,

dans la majeure partie des cas, avoir confondu la vacuole et les corpuscules métachromatiques contenus dans son intérieur avec le noyau. Ils décrivent en effet, dans les premières phases du développement, un noyau vacuolaire, constitué d'un nucléole et de quelques éléments chromatiques, qui ressemble beaucoup plus à la vacuole qu'au noyau. Ces auteurs ont eu le tort de ne se servir, pour des observations aussi complexes, que d'une seule matière colorante; ils ont choisi pour cela le procédé d'Heidenhain, qui s'il est capable de rendre de grands services et de donner souvent les meilleures préparations, a le désavantage d'être irrégulier et doit constamment être soumis au contrôle d'autres matières colorantes. Il est à remarquer, en effet, que dans les dessins de Janssens et Leblanc, il n'existe au début du développement aucune trace de vacuole, alors que nous n'avons pas observé de cellules de levures dépourvues de vacuole. Enfin Janssens et Leblanc observent ce noyau à l'état frais sous forme d'un nucléole réfringent, animé de mouvements browniens, ce qui ne laisse aucun doute sur leur confusion.

Leur noyau à ce stade ne serait donc autre chose que la vacuole, et le nucléole ainsi que les éléments chromatiques représenteraient les corpuscules métachromatiques se trouvant toujours dans cette vacuole et ressemblant souvent en effet à un noyau.

Plus tard ils observent une vacuolisation du protoplasme au dépens du noyau qui diminue de taille et perd ses vacuoles. A ce moment, ils voient le véritable noyau et la figure de ce noyau correspond à peu près à la nôtre.

Au bout de quarante-huit heures, Janssens et Leblanc figurent un protoplasme complètement dépourvu de vacuole, à structure réticulée typique, qui dans les nœuds de son réticulum se remplit de granules, qu'ils considèrent comme des matières de réserve de nature nucléo-albuminoïde et qui disparaissent au moment de la sporulation. Ces granules se colorent d'après eux avec l'hématoxyline de Heidenhain, mais se décolorent plus facilement que le noyau. En outre ils se colorent non pas en vert mais en bleu outremer par le vert de méthyle. Ils les font correspondre aux corps décrits par Raum, Eisenschitz et Hieronymus. Ces caractères paraissent les identifier à nos corpuscules métachromatiques. Janssens et Leblanc les ont donc pris ainsi que la vacuole pour le noyau au début du développement et ne les ont différencié de cet organe que dans la suite, lorsqu'ils deviennent plus abondants. Néanmoins cette structure du protoplasme sans vacuole, que nous n'avons jamais rencontrée à aucun stade du développement, nous semble correspondre à l'apparition de vacuole glyco-

génique. Ils auraient pris, d'après nous, cette vacuole légèrement réfringente, qui occupe toute la cellule, pour le protoplasme, et une partie des granules qu'ils décrivent pourraient bien être les éléments figurés que nous avons signalés dans la vacuole glycogénique et qui fixent la couleur. Parfois ils sont nombreux et offrent l'illusion d'un réticulum très fin. (Comparer les figures de ces auteurs avec les figures, 16, 17, 18, 19 et 20 de notre Pl. III.)

Enfin vers la fin de la fermentation, Janssens et Leblanc retrouvent la structure du début avec un noyau à l'état vacuolaire qui pour nous serait la vacuole, ce qui est conforme à ce que nous avons observé après la disparition du glycogène.

Maffuci et Sirleo ont également commis la même erreur que Janssens et Leblanc et ont confondu la vacuole et son contenu avec le noyau.

Un certain nombre d'observateurs figurent des granules de chromatine disséminés dans le protoplasme (Curtis). Ceux-ci devaient être également en présence des corpuscules métachromatiques, mais n'ont probablement pas remarqué leur localisation dans l'intérieur des vacuoles.

Quant aux dispositions décrites par Hieronymus, elles résultent de ces mêmes corpuscules

métachromatiques, qui lorsqu'ils sont en grand nombre dans les vacuoles et dans le protoplasme peuvent présenter des aspects très divers, quelquefois spiralés, qui ne sont d'ailleurs qu'accidentels. Ils peuvent même offrir des formes anguleuses que Hieronymus a prises pour des cristalloïdes.

Bouin a cherché à expliquer ces figures en cultivant le *S. cerevisiæ* dans 10 p. 100 de sucre, milieu qu'avait employé Hieronymus. Il arriva à produire des cellules qui se multiplient à peine, et se gonflent par suite de la trop forte concentration du milieu et qui selon lui seraient plurinucléées. Les noyaux se divisant par amitose et se succédant en forme de chapelets donneraient quelquefois par leur ensemble des aspects spiralés. Nous avons répété ces expériences, mais dans aucun cas nous n'avons trouvé cette multiplication du noyau qui très probablement est également due aux corpuscules métachromatiques.

Au contraire Casagrandi, qui a décrit avec beaucoup de soin l'arrangement de ces granules, les considère comme absolument indépendants du noyau, mais leur attribue à tort la nature de globules d'huile. Ils bruniraient, suivant lui, par l'acide osmique et se dissoudraient dans l'éther et le chloroforme. Vill avait trouvé antérieurement des globules d'huile dans

les cellules de levures, mais dans les vieilles cultures. Janssens et Leblanc ne signalent pas de corps gras dans le développement des levures.

Duclaux a constaté, d'autre part, la présence de globules d'huile, qui se dissolvent par l'éther, et diminuent sensiblement le poids de la cellule après leur dissolution.

En réalité toutes ces confusions proviennent de ce que beaucoup des auteurs qui se sont occupés de cette question n'ont distingué les globules d'huile des corpuscules métachromatiques, qui dans certains cas sont en effet très faciles à confondre ; mais les doubles colorations que nous avons indiquées, à l'aide de l'hémalun et de l'acide osmique, dissipent toute incertitude.

Il nous reste maintenant à examiner l'interprétation de Wager.

On sait qu'Eisenschitz avait admis que la vacuole des levures représentait le noyau et que les corpuscules se trouvant dans son intérieur, possédant les propriétés microchimiques de la nucléine, étaient des éléments chromatiques; Wager, s'appuyant sur ces observations, figure *une vacuole remplie de granules de chromatine* et *un nucléole* (noyau des auteurs) toujours accolé à cette vacuole, dont l'ensemble constituerait le *noyau* des levures. Wager, qui a suivi le développement des levures avec le plus

grand soin, s'est servi comme point d'appui à son interprétation de méthodes de coloration telles que les mélanges de fuchsine et de vert de méthyle, qui ont l'inconvénient de ne pas donner aux corpuscules métachromatiques leur caractère essentiel, c'est-à-dire leur coloration rouge. Par suite, étant donnée la petitesse de ces corpuscules et leur aspect quelquefois réticulé, il est très aisé de les confondre avec des éléments chromatiques. De plus, le noyau ne se différencie qu'imparfaitement avec ces méthodes et ne laisse jamais apercevoir les détails de sa structure.

Mais l'étude minutieuse que nous avons faite de champignons plus gros et chez lesquels l'existence du noyau ne laisse aucun doute, tels que le *D. species* et l'*O. lactis*, et la comparaison de la structure de ces champignons avec celles qu'on obtient chez les levures suffit à démontrer l'indépendance du noyau et de la vacuole et des corpuscules qu'elle renferme. Ce noyau, qui se colore en bleu par l'hémalun et possède une structure caractérisée avec membrane, nucléoplasme et granules chromatiques, correspond exactement aux noyaux qu'on a décrits dans la plupart des champignons. Il est impossible de le considérer comme un simple nucléole. D'autre part si la vacuole est très souvent en intime contact avec le noyau, il peut arriver

que ces deux organes soient nettement séparés et c'est le cas général chez les moisissures, qui nous montrent cependant une structure analogue à celle des levures par tous les autres côtés. Cette proximité de la vacuole et du noyau, tout au contraire, s'explique plus simplement par la petitesse de la cellule et la grosseur de la vacuole qui font que tous les organes sont presque nécessairement en contact.

Il peut se faire aussi que les corpuscules métachromatiques soient capables de jouer un rôle nutritif vis-à-vis du noyau ; certaines dispositions que nous avons décrites paraissent en faveur de cette idée ; il est facile de comprendre de cette manière qu'il puisse exister une liaison entre le noyau et la vacuole. Le noyau qui paraît jouer un rôle important dans la nutrition cellulaire aurait besoin en ce cas d'être en relation avec la vacuole qui contient les corpuscules métachromatiques et peut-être aussi d'autres produits qui échappent à notre observation.

D'autre part l'analyse microchimique nous montre que ces granules ne paraissent pas avoir les caractères de la nucléine et les auteurs (Curtis, Eisenschitz) qui ont constaté leur disparition après traitement par les dissolvants de la nucléine n'ont pas remarqué que ces corpuscules existaient toujours, mais avaient

perdu leur propriété de fixer les matières colorantes.

D'ailleurs leur taille, ordinairement petite chez les levures, peut prendre des dimensions considérables chez les moisissures et il devient alors impossible de leur donner la signification de grains de chromatine.

Enfin la manière dont nous les verrons se comporter pendant la sporulation indique très nettement qu'ils n'ont aucun caractère nucléaire.

Il est vrai qu'Eisenschitz distingue deux catégories de granules : 1° les uns plasmatiques, qui résistent aux dissolvants de la nucléine ; 2° les autres situés dans la vacuole et qui possèdent les propriétés de la nucléine. Mais on ne doit donner qu'une importance très relative à la microchimie, surtout lorsqu'il s'agit d'organismes si petits qui prêtent à tant d'erreurs.

Nous avons vu d'autre part que la distinction établie par Wager entre les granules de matière de réserve (protéine et huile) et les granules chromatiques, était inexacte, étant donné que ces granules, sujets à de grandes variations de dimensions et de formes, présentent cependant vis-à-vis du bleu de méthylène les mêmes caractères de métachromasie. Tous ces granules se rattachent donc aux corpuscules méta-

chromatiques (1), et il est aujourd'hui admis par tous les auteurs qui se sont occupés sérieusement de ces corpuscules que ce sont des corps extra-nucléaires (Zacharias, Palla, Bütschli, Lauterborn, Kunstler).

De même la prétendue présence de la nucléine, mise en évidence par Macallum sur les bords de la vacuole des levures ou dans les nœuds du protoplasme, ne peut avoir qu'une signification des plus douteuses : quoi qu'en dise l'auteur, il n'y a aucune raison pour que la nucléine soit la seule substance de la cellule qui puisse contenir des composés assimilés du fer.

Résumé. — On trouve donc une très grande conformité de structure entre le *S. cerevisiæ* et les moisissures (*D. species* et *O. lactis*) que nous avons précédemment décrites. On y remarque en effet :

1° *Un noyau* (nucléole de Wager) présentant une structure très caractérisée (avec nucléohyaloplasme, granules chromatiques, membrane). Ce noyau se divise par *amitose;*

2° Des granules (granules de Raum, Hiero-

(1) Le protoplasme peut contenir aussi vers la fin du développement quelques globules d'huile provenant d'un commencement de dégénérescence. Il y existe enfin les éléments figurés que nous avons rencontrés dans les vacuoles à glycogène.

nymus, Curtis) très variables par leur forme, qui se rattachent tous aux corpuscules métachromatiques. Ils sont le plus souvent contenus dans l'intérieur des vacuoles (vacuoles nucléaires d'Eisenschitz et de Wager), qui contrairement à l'opinion de Wager sont indépendantes du noyau.

Le glycogène paraît se localiser dans des vacuoles distinctes des précédentes, qui se forment au cours du développement.

Dans les cultures âgées, on voit apparaître des globules d'huile que l'on ne doit pas confondre avec les corpuscules métachromatiques. Pendant le développement les vacuoles glycogéniques se fusionnent en une seule vacuole, qui envahit la cellule. Les vacuoles primitives ont disparu ; le protoplasme et le noyau sont déjetés contre la membrane. Les corpuscules métachromatiques sont alors disséminés dans le protoplasme. Vers la fin du développement la vacuole glycogénique disparaît graduellement, la vacuole à corpuscules métachromatiques se reforme et les cellules reviennent à leur état primitif.

II. — Sporulation

Les phénomènes cytologiques qui accompagnent la sporulation sont encore peu connus. Ils présentent néanmoins un très vif intérêt, tant par eux-mêmes qu'au point de vue de la classification. La signification des spores endogènes des levures a été, en effet, très diversement considérée ; certains botanistes ont donné à l'appareil de fructification des levures la valeur d'une asque (Reess, de Bary, Hansen), les autres l'ont rapproché des sporanges (Brefeld). Van Tieghen a même attribué la formation des spores à un état maladif du protoplasme qui aurait pour cause une altération des cellules de levure par les bactéries. L'histologie permet d'éclairer cette question. Il n'y a guère cependant que Zalewsky, Raum et Wager qui aient essayé jusqu'ici d'étudier le développement histologique des spores. Aussi avons-nous cru intéressant de suivre de très près ces phénomènes.

Phénomènes protoplasmiques. — Ainsi que nous l'avons déjà dit, nous avons employé pour l'étude de ces phénomènes les cultures sur tranches de carotte. Le développement se montre très semblable à celui que nous avons observé dans le liquide Mayer. Dans

les premiers stades, la levure est constituée d'une vacuole renfermant des corpuscules métachromatiques; ceux-ci (1) sont toujours plus nombreux que dans le liquide Mayer et se fusionnent pour former des sphérules atteignant quelquefois un diamètre supérieur à 2 μ. Dans la suite, on assiste à la formation d'une vacuole glycogénique, qui envahit toute la cellule. Vers le troisième ou quatrième jour, cette dernière diminue un peu de volume et la vacuole à corpuscules métachromatiques reparaît sur un des côtés de la cellule. Les cellules renferment alors une très grande abondance de glycogène et de corpuscules métachromatiques, condition qui paraît indispensable à la formation des spores : c'est à ce moment que débutent les phénomènes de sporulation. La vacuole à corpuscules métachromatiques, ainsi que la vacuole glycogénique se divisent, en gardant chacune leur contenu, de sorte que l'on distingue encore des vacuoles à corpuscules métachromatiques et des vacuoles à glycogène. Finalement la cellule devient entièrement vacuolaire. Les vacuoles à corpuscules métachromatiques sont remplies d'une telle

(1) Laurent a observé que le glycogène était beaucoup plus abondant sur les milieux solides que sur les milieux liquides. Peut-être doit-on rapprocher ce fait de ce que nous constatons pour les corpuscules métachromatiques.

quantité de granules que leur contour est difficile à observer et l'on ne distingue nettement les mailles du protoplasme qu'après une décoloration prolongée : la cellule apparaît alors comme formée d'un grand nombre de vacuoles de dimensions assez régulières, limitées par des mailles très fines de protoplasme et qui ressemblent aux structures alvéolaires dessinées par Bütschli chez les bactéries ; les vacuoles à corpuscules métachromatiques pourraient même donner l'illusion d'un corps central. Ces vacuoles sont ordinairement situées vers le centre, ou quelquefois sur un des côtés de la cellule. Ces structures s'observent avec beaucoup de netteté lorsqu'on emploie les colorations au bleu de méthylène ou au bleu polychrome, qui différencient très bien les corpuscules métachromatiques.

Le noyau se trouve parfois sur un côté de la cellule, mais il occupe le plus souvent le centre. Il est toujours en étroite connexion avec les vacuoles à corpuscules métachromatiques, situé, soit sur un côté de ces vacuoles, soit au centre. Quelquefois même il se trouve complètement masqué par ces vacuoles et se laisse difficilement distinguer. Ce noyau, qui avait toujours gardé sa structure normale, apparaît dès maintenant comme une simple tache sphérique et homogène.

Dissolution des corpuscules métachromatiques. — A ce stade apparaît un phénomène très curieux, et qui est de nature à nous renseigner sur le rôle de ces corpuscules métachromatiques. Ces corpuscules qui jusqu'à ce moment, avaient conservé des dimensions variables et dont quelques-uns étaient très gros, diminuent peu à peu de taille et de nombre. Ils n'apparaissent plus bientôt que sous forme de très petites ponctuations localisées aux bords des vacuoles qui alors prennent une *coloration* uniformément *rouge pâle* avec toutes les matières colorantes qui donnent aux corpuscules métachromatiques leur coloration rouge caractéristique (hémalun, violet de gentiane) (Pl. XII, fig. de 26 à 28). Avec le vert de méthyle, elles peuvent même se colorer en rose violacé. Mais les meilleures préparations sont obtenues à l'aide du bleu de méthylène et surtout du bleu polychrome : avec le bleu de méthylène, les corpuscules apparaissent en rouge violacé et le contenu des vacuoles se colore uniformément en rouge pâle, tandis qu'avec le bleu polychrome les corpuscules se teignent en rouge vif et le contenu des vacuoles en rouge clair. Une telle coloration, qui correspond avec une diminution du nombre des corpuscules métachromatiques, ne paraît pouvoir s'expliquer que par *une sorte de dissolution de ces corpus-*

cules dans l'intérieur des vacuoles. La présence d'un contenu acide dans la vacuole n'expliquerait rien, car si certaines matières colorantes, telles que l'hémalun, se montrent très sensibles à l'action des acides, le bleu de méthylène est incapable de virer au rouge par quelque acide qu'on le traite, et on ne connaît guère jusqu'alors de substance (1) autre que celles des corpuscules métachromatiques qui puisse donner à cette matière colorante une pareille teinte.

D'autre part cette coloration rouge se montre toujours avec la plus grande netteté et ne subit pas la moindre variation de nuance, lorsqu'on l'observe au microscope en faisant varier le point. Elle ne peut donc pas être attribuée à une diffraction.

De pareils phénomènes constituent une notion toute nouvelle dans la question des corpuscules métachromatiques. Ils ont paru en effet échapper jusqu'ici à l'observation de tous ceux qui ont étudié ces corps. Cependant il semble bien que Raum ait aperçu des phénomènes de cet ordre et cela expliquerait comment il a pu admettre que les vacuoles étaient capables à de certains moments de se trans-

(1) Les *Mastzellen* prennent cependant une coloration rouge violet avec le bleu de méthylène (Voir Hennegny : *Traité sur la cellule*, p. 241.)

former en grains sporogènes. D'autre part, Krompecher a décrit tout récemment des corps se trouvant localisés au centre des bactéries dans un espace hyalin et qui se colorent en rouge par le bleu de méthylène. Ces corps naîtraient très petits et au moment de leur différenciation, donneraient à la partie centrale de la cellule cette coloration uniformément rouge. Cette coloration ne serait-elle point due au contraire à de semblables phénomènes de dissolution, plutôt qu'à un commencement de différenciation ?

Divisions nucléaires. — C'est à ce stade que le noyau commence sa première division. Les mailles protoplasmiques s'épaississent autour du noyau, le protoplasme s'y accumule et le noyau se trouve entouré d'une zone protoplasmique qui lui donne un contour légèrement irrégulier ; puis le noyau apparaît constitué de deux petites masses arrondies de forme plus ou moins régulière, ayant même souvent un aspect granuleux et entourées de protoplasme. Ces deux masses s'écartent parfois et vont se placer aux deux pôles de la cellule, toujours entourées de protoplasme et réunies par un mince filet protoplasmique, ou se placent dans des endroits variables ; mais le plus souvent elles restent très près l'une de l'autre au centre de la cellule et

recommencent aussitôt à se diviser par un procédé analogue (Pl. III, fig. de 21 à 30). Le protoplasme entoure toujours le noyau et possède une assez forte affinité pour les matières colorantes, de telle sorte que les figures de division du noyau sont toujours très confuses et qu'il paraît impossible de se rendre compte du mode suivant lequel elles s'effectuent. D'ailleurs nous ne chercherons pas pour le moment à interpréter ces phénomènes, nous proposant de revenir sur cette question à propos du *S. Ludwigii*, qui est particulièrement favorable à cette étude.

Formation des spores. — Aussitôt après la dernière division, les noyaux entourés d'une même zone protoplasmique, et généralement très voisins l'un de l'autre, paraissent s'entourer d'une membrane protoplasmique très mince et sombre qui commence à apparaître tout autour du noyau laissant libre pendant quelque temps le côté opposé au noyau, et donnant aux ébauches de spores une forme de calotte qui petit à petit se forme complètement; ainsi limitée, la spore ne tarde pas à s'entourer d'une zone hyaline qui paraît être l'origine de la membrane cellulosique (Pl. III, fig. de 31 à 35).

Les spores sont d'abord extrêmement petites;

elles sont constituées d'une forte membrane, d'un noyau toujours très petit accolé à l'un des côtés de la membrane et d'un protoplasme rayonnant autour de ce noyau et dont les rayons délimitent autant de vacuoles.

Peu à peu ces spores grossissent aux dépens de l'épiplasme; celui-ci se désorganise peu à peu, les vacuoles se fusionnent, les mailles protoplasmiques se résorbent et finalement il ne subsiste plus qu'un liquide cellulaire tenant en suspension du glycogène, quelques restes de corpuscules métachromatiques, et le liquide provenant de leur dissolution qui lui donne une couleur uniformément rouge avec le bleu de méthylène.

En grossissant, les spores absorbent le glycogène et en accumulent une certaine partie dans leurs vacuoles; de même on aperçoit un certain nombre de corpuscules métachromatiques paraissant disposés dans les rayons protoplasmiques de ces spores, dont le nombre augmente au fur et à mesure que la spore se gonfle. Il reste cependant assez longtemps quelques débris de corpuscules métachromatiques qui comprimés entre les spores s'accumulent autour de leurs membranes.

A leur maturité les spores ont absorbé tout l'épiplasme et se sont gonflées de façon à occuper

tout le volume de l'asque. Il n'existe plus aucune trace de corpuscules métachromatiques en dehors des spores.

Fusion nucléaire. — Janssens et Leblanc avaient observé une division du noyau, s'effectuant quelques heures avant le début des phénomènes de sporulation, dans chaque cellule se préparant à former des spores. Les deux noyaux ainsi formés acquerraient une certaine indépendance, mais resteraient toujours très près l'un de l'autre ; au bout d'un certain temps, ces auteurs auraient observé une refusion de ces deux noyaux en un noyau unique qui aurait renfermé à peu près le double de la nucléine contenue dans les noyaux ordinaires. Ce noyau ainsi formé ne tarderait pas alors à se diviser dans le but de répartir un noyau dans chacune des spores. Ces auteurs considéraient la fusion de ces deux noyaux comme un *acte de sexualité rudimentaire*, ayant une signification analogue aux phénomènes décrits chez les Ascomycètes et les Basidiomycètes par Dangeard et Sapin-Trouffy. L'asque serait donc un *œuf*.

Wager au contraire n'a jamais observé cette conjugaison nucléaire ; il l'attribue à une erreur de Janssens et Leblanc qui auraient confondu sa *vacuole nucléaire* avec le noyau. D'après lui,

cette *vacuole nucléaire* se diviserait au moment de la sporulation, et, ce qu'il considère comme le nucléole, se distinguerait peu. Ils auraient observé au début de cette vacuolisation la première division de la *vacuole nucléaire*, qui formerait suivant eux les deux noyaux destinés à se conjuguer. Dans les stades suivants le protoplasme serait entièrement vacuolaire et le *nucléole* se différencierait plus facilement : à ce moment ils auraient donc vu le *nucléole* et ils l'auraient considéré comme le noyau résultant de la fusion des deux noyaux qu'ils avaient cru observer antérieurement (1).

Nous avons suivi avec beaucoup de soin le développement du *S. cerevisiæ* cultivé sur carotte depuis le début du développement jusqu'à la formation des spores et jamais nous n'avons aperçu de division du noyau suivie de conjugaison.

Nous avons observé à ce point de vue toutes les levures que nous étudierons dans la suite et dans aucune nous n'avons constaté les conjugaisons décrites par Janssens et Leblanc. Ceci nous dispensera donc de revenir sur ce sujet.

(1) L'explication de Wager nous paraît exacte, les dessins de Janssens et Leblanc où ils représentent les deux noyaux ne contiennent, en effet, aucune trace de vacuoles, et les noyaux pourraient bien être des vacuoles à corpuscules métachromatiques.

Les Saccharomyces s'éloigneraient donc par ce caractère des Exoascées auxquelles beaucoup d'auteurs les rattachent (de Bary, Hansen); chez ces dernières, en effet, le noyau de la cellule-mère de l'asque proviendrait d'après Dangeard de la fusion de deux noyaux primitifs.

Germination des spores. — Au moment de la germination, les spores sont très gonflées; elles se moulent à la paroi de l'asque qu'elles occupent en entier, et pressées les unes contre les autres, elles offrent un contour irrégulier, et plus ou moins polygonal. La paroi de l'asque se déchire ou subsiste suivant les circonstances. Ces spores contiennent ordinairement une seule vacuole résultant de la fusion des vacuoles primitives et qui renferme une grande quantité de corpuscules métachromatiques qui se sont développés au fur et à mesure que l'épiplasme a été absorbé. Le glycogène très abondant jusque-là disparaît presque totalement. Un certain nombre de ces spores peuvent entrer en dégénérescence et ne pas se développer; les autres germent en produisant d'abord un bourgeon, qui généralement est suivi de l'apparition d'un certain nombre d'autres disposés dans des endroits quelconques autour de la spore.

Le bourgeonnement des spores s'effectue de

la même manière que le bourgeonnement des cellules végétatives ; la vacuole se divise avec le noyau et s'introduit dans chaque bourgeon avec une portion des corpucules métachromatiques renfermés dans la spore. La division du noyau s'accomplit suivant le procédé amitotique habituel (Pl. III, de 36 à 40).

Il existe donc ici une disparition du glycogène qu'on observe un peu avant la germination ou au moment de la germination, tandis que les corpuscules métachromatiques ne paraissent pas être absorbés et pénétrent au contraire dans les jeunes bourgeons. Malgré cela, l'ensemble de ce que nous avons observé pendant le développement semble bien indiquer qu'il joue le rôle de matière de réserve.

CHAPITRE IV

S. Pastorianus. — S. ellipsoïdeus. S. subcutaneus tumefaciens. S. membranæfaciens. — S. anomalus.

I. — Saccharomyces Pastorianus I (Hansen)

Le *S. Pastorianus I*, découvert par Hansen dans la poussière de l'air d'une tannerie de Copenhague, ressemble beaucoup à celui que Pasteur a appelé de ce nom dans ses études sur la bière. Les cellules sont ordinairement allongées; il en existe cependant de rondes. Les spores sont petites et n'atteignent que rarement 5 μ. Le plus souvent leur diamètre varie entre 1,5 et 5,5 μ. Leur nombre dans une même cellule varie de un à quatre, mais peut atteindre les chiffres de cinq à dix. Les voiles sont formés de cellules très allongées.

Développement végétatif. — Dans le liquide Mayer, on observe chez cette levure un développement qui ressemble beaucoup à celui que nous venons de décrire pour le *S. cerevisiæ*.

Les cellules jeunes ont une forme ovale ou sphérique. Elles possèdent à leur centre de petites vacuoles renfermant quelques corpuscules métachromatiques ; plus tard les vacuoles se réunissent ordinairement en une seule. en même temps que les corpuscules métachromatiques se développent et augmentent de nombre.

Le noyau est le plus souvent en contact avec cette vacuole et vers le milieu de la cellule. Il atteint environ 1 μ de diamètre et se présente assez souvent comme une masse homogène, qu'on emploie pour sa différenciation l'hématoxyline au fer ou l'hémalun. Cependant, dans les meilleures préparations, il montre une structure analogue à celle que nous avons observée chez le *S. cerevisiæ* avec un *nucléohyaloplasme incolore*, une *membrane*, un *nucléole* et *quelques grains de chromatine* très irrégulièrement disposés. Très souvent on n'aperçoit que le nucléole (Pl. IV, fig. de 8 à 14).

Le bourgeonnement s'effectue de la même manière que chez le *S. cerevisiæ*. La vacuole envoie dans le jeune bourgeon un petit prolongement, qui se sépare ensuite de la vacuole

mère en gardant une partie des corpuscules métachromatiques.

Le noyau se divise soit en même temps, soit, plus fréquemment, après la vacuole. Sa division s'accomplit par un procédé analogue à celui que nous avons décrit chez la levure précédente. Sans changer de place, il s'allonge légèrement et se partage en deux portions dont l'une va rejoindre le bourgeon, ou plus souvent il s'allonge beaucoup, gagne l'orifice du bourgeon, se rétrécit et se coupe en son milieu, et l'un des deux noyaux fils ainsi formés s'introduit dans le bourgeon.

Au bout d'un certain temps les cellules manifestent une tendance à s'allonger, elles deviennent ovales et se remplissent de glycogène; cependant quelques-unes d'entre elles restent sphériques. Dans les cellules allongées, qui sont de beaucoup les plus nombreuses, le glycogène qui avait d'abord apparu dans le protoplasme se localise ordinairement dans deux vacuoles, situées aux deux pôles de la cellule.

La cellule comprend alors une ou un certain nombre de vacuoles à corpuscules métachromatiques au centre et au voisinage des noyaux, et deux vacuoles glycogéniques aux deux pôles.

Dans les formes sphériques, les vacuoles glycogéniques occupent ordinairement l'un des côtés de la cellule.

Cette structure paraît se conserver pendant longtemps. Le glycogène, moins abondant que dans le *S. cerevisiæ*, reste localisé dans les deux vacuoles polaires, et les vacuoles à corpuscules métachromatiques subsistent pendant tout le développement.

Dans les voiles, les cellules sont quelquefois très allongées, mais malgré cela possèdent une structure semblable et on n'observe ordinairement qu'un seul noyau par cellule.

Sporulation. — Dans les premières phases de la sporulation les cellules prennent un aspect alvéolaire. Le protoplasme apparaît alors entièrement formé de petites vacuoles délimitées par des mailles très fines de protoplasme. (Pl. XI, fig. de 3 à 6). Il existe toujours deux catégories de vacuoles, les unes, ordinairement disposées au centre de la cellule, qui contiennent une très grande abondance de corpuscules métachromatiques, et les autres, généralement polaires, qui renferment exclusivement du glycogène. Cette vacuolisation effectuée, on voit se produire dans l'intérieur des vacuoles à corpuscules métachromatiques le phénomène que nous avons déjà constaté dans la levure précédente : les corpuscules métachromatiques diminuent de nombre et les vacuoles qui les contiennent prennent une *couleur rouge pâle* avec la plupart des matières colorantes (Pl. XII, fig. de 29 à 38).

Le noyau se trouve presque toujours au voisinage des vacuoles à corpuscules métachromatiques. Il apparaît sous forme d'une masse sphérique homogène. Le protoplasme s'accumule bientôt autour de ce noyau et c'est à ce moment que ce dernier commence ses divisions successives en vue de la formation des spores.

Cette division se produit de la même manière que dans le *S. cerevisiæ* et sans qu'on puisse s'en faire une idée exacte. Les noyaux fils vont se placer aux pôles de la cellule ou restent très proches les uns des autres.

Les spores naissent comme dans le *S. cerevisiæ;* elles apparaissent d'abord sous forme de très petites masses de forme irrégulière contenant chacune un noyau et se délimitant par une bordure protoplasmique sombre qui commence à naître au voisinage du noyau, pour se fermer ensuite dans sa région opposée; puis elles s'enveloppent bientôt d'une zone hyaline, qui marque le début de la formation de la membrane cellulosique (Pl. IV, fig. de 15 à 21).

Les spores formées sont constituées d'un très petit noyau accolé à l'un des côtés de la membrane et d'un protoplasme rayonnant autour de ce noyau. Au fur et à mesure qu'elles grossissent, elles absorbent l'épiplasme, qui se désorganise et se transforme en un liquide cellulaire contenant du glycogène, la substance qui se

colore en rouge et quelques restes de corpuscules métachromatiques qui diminuent de plus en plus et finissent par disparaître complètement.

Une fois mûres, les spores sont très grosses et occupent tout le volume de l'asque.

Leur germination présente les mêmes caractères que le *S. cerevisiæ* et ne diffère pas du bourgeonnement normal des cellules végétatives (Pl. IV, fig. de 22 à 25).

II. — Saccharomyces Ellipsoideus I (Hansen)

Le *S. ellipsoïdeus I* est une levure à fermentation basse, trouvée par Hansen sur des raisins mûrs dans les Vosges ; il ressemble beaucoup au *S. ellipsoïdeus* de Reess et de Pasteur. Ses formes, d'ordinaire elliptiques, peuvent devenir rondes ou même s'allonger en boudins.

Les spores atteignent un diamètre compris entre 2 et 4 μ. Leur nombre varie entre 1 et 4.

Les voiles renferment des cellules très allongées.

Développement végétatif. — La structure du

S. ellipsoïdeus diffère fort peu de celle des précédentes levures. Il existe, dans les premières phases du développement, plusieurs petites vacuoles contenant un nombre variable de corpuscules métachromatiques. Ces vacuoles grossissent et se fusionnent, constituant alors une grosse vacuole occupant le centre de la cellule.

Le noyau, ordinairement accolé à cette vacuole; possède une structure très visible dans les bonnes préparations avec *nucléoplasme* limité par une *membrane*, *nucléole* et *granules chromatiques* (Pl. III, fig. de 41 à 48 et Pl. IV, fig. 1, 2, 3).

Le bourgeonnement se produit suivant le même procédé que dans les levures que nous venons d'étudier. La division du noyau s'effectue toujours par *amitose*.

Le glycogène se montre en bien moindre abondance que dans les levures précédentes et se localise dans de petites vacuoles naissant à des endroits indéterminés de la cellule. Dans les cellules allongées, on peut retrouver la disposition que nous avons observée chez le *S. Pastorianus* avec une vacuole centrale à corpuscules métachromatiques et deux vacuoles polaires renfermant le glycogène.

Sporulation. — Les spores sont difficiles à obtenir dans les cultures sur tranches de carotte;

au contraire elles se forment très rapidement sur les blocs de plâtre.

Les phénomènes histologiques de la sporulation ne diffèrent pas de ceux que nous avons observés jusqu'ici.

On remarque encore une vacuolisation du protoplasme et l'on distingue des vacuoles renfermant du glycogène, et des vacuoles à corpuscules métachromatiques, dans lesquels on observe à certains moments des *phénomènes de dissolution*.

La division du noyau et la formation des spores se produisent de la même façon, ainsi que le montrent nos figures (Pl. IV, fig. de 4 à 8 et Pl. XII, fig. de 39 à 43).

III. — Saccharomyces subcutaneus tumefaciens (Curtis)

Cette levure fut découverte, il y a quelques années, par Curtis dans certaines tumeurs malignes. Elle ne diffère pas des levures ordinaires. Les cellules ont une forme sphérique. La membrane peut, lorsque la levure vit en parasite dans les tissus, donner lieu à des formations capsulaires, comme cela existe chez la plupart des levures pathogènes.

Curtis a cherché à observer la structure de cette levure ; il signale, comme nous l'avons vu, la présence de deux catégories de granules disséminés dans le protoplasme ; les uns, qui se colorent intensivement par le vert de méthyle, sont considérés par lui comme des granules de chromatine; les autres sont très réfringents et ne se colorent pas; ce seraient des globules d'albumine jouant le rôle de produits de réserve. Le noyau serait donc diffus dans le protoplasme.

Le *S. tumefaciens* nous a montré dans ses cellules, au début du développement, un certain nombre de petites vacuoles, renfermant chacune quelques granules métachromatiques que Curtis a pris pour des grains de chromatine. Nous avons toujours observé en outre un *noyau* qui se colore facilement par l'hématoxyline de Heidenhain et par l'hémalun. Il est toujours très petit et se présente sous l'aspect d'une masse sphérique et homogène enveloppée parfois d'une zone hyaline de nucléoplasme (Pl. IV, fig. 26, 27 et 28).

Ce noyau se divise par le procédé habituel. Tantôt, il se partage, en s'étranglant, en deux petites masses, dont l'une reste à sa position primitive et dont l'autre se dirige dans la nouvelle cellule, tantôt il s'allonge, pénètre dans le col du bourgeon et s'y sépare en deux portions.

Le glycogène est toujours rare dans les cellules du *S. tumefaciens*, même dans les milieux les plus favorables à sa formation. Il apparaît, lorsqu'il existe, dans le protoplasme qu'il imprègne, mais il ne semble pas se localiser dans les vacuoles.

Vers la fin du développement on observe souvent la formation de gouttelettes réfringentes répondant probablement aux granules albuminoïdes de Curtis, et qui nous paraissent être des globules d'huile.

IV. — Saccharomyces anomalus (Hansen)

Hansen a désigné sous ce nom une curieuse espèce rencontrée dans une levure impure d'une brasserie de Bavière. Elle a des cellules petites, ovales, quelquefois allongées et ses formes générales se rapprochent plus des Torulas que des Saccharomyces. Elles forment à la surface du liquide des voiles analogues à ceux du *S. membranæfaciens*. Au bout de quelques jours, tant dans ce voile que dans les cellules du fond, se développent des spores qui ont une forme très caractéristique. Elles ont l'aspect de chapeaux formés d'une demi-sphère reposant sur une membranes épaisse, qui les

déborde. Il y a dans chaque cellule mère de deux à quatre spores. Leur diamètre est de 2 à 3 μ. Cette forme de spores ressemble beaucoup à celle de l'*Endomyces decipiens*, avec lequel du reste Hansen et Barker ont rapproché cette levure.

Développement végétatif. — Au commencement du développement, le *S. anomalus* contient plusieurs vacuoles disséminées dans un protoplasme très dense; le plus souvent il en existe deux situées au voisinage des deux pôles de la cellule. Ces vacuoles renferment un certain nombre de corpuscules métachromatiques d'abord très petits, qui se fusionnent dans la suite pour constituer quelques sphérules de taille moyenne.

Le noyau est placé soit à l'une des extrémités de la cellule, soit plus ordinairement au milieu. Il se trouve quelquefois en contact avec l'une des vacuoles ou pressé entre les deux vacuoles, mais il en est très souvent séparé.

Ce noyau est un petit corps sphérique d'environ 0,8 μ de diamètre, constitué d'un *chromoblaste* entouré d'un *nucléoplasme incolore*. Dans quelques cas on distingue une *membrane* enveloppant le nucléoplasme (Pl. IV, fig. de 29 à 35).

La division se fait presque toujours par un partage du chromoblaste en deux masses égales, analogue à celui que nous avons rencontré dans le *D. species* et l'*O. lactis*.

On remarque souvent que les bourgeons naissent très près des noyaux et il pourrait exister dans cette levure certaines liaisons entre la position du noyau et celle des bourgeons, mais il y a cependant de nombreuses exceptions.

Au cours du développement, il se forme un certain nombre de vacuoles renfermant du glycogène et disposées soit aux deux pôles de la cellule, soit au centre entre deux vacuoles à corpuscules métachromatiques.

Sporulation. — Dans la sporulation, on remarque comme toujours une vacuolisation du protoplasme et une spécialisation en vacuoles à glycogène et vacuoles à corpuscules métachromatiques; celles-ci occupent ordinairement le centre de la cellule, les premières sont surtout situées à ses extrémités.

On observe à un stade ultérieur les mêmes *phénomènes de dissolution de corpuscules métachromatiques*, que nous avons toujours rencontrés jusqu'ici au début de la sporulation et qui se manifestent par de très belles colorations rouges des vacuoles (Pl. XII, fig. de 47

à 49). Le noyau apparaît sur un des côtés de la cellule, appuyé contre la membrane et en contact avec les vacuoles à corpuscutes métachromatiques. Le protoplasme se condense autour de ce noyau, puis commencent la division du noyau et la formation des spores qui paraissent s'accomplir suivant le procédé normal. Les spores naissent en des endroits très variables, soit au centre, soit plus souvent aux deux pôles de la cellule. Elles apparaissent comme d'ordinaire en forme de petites calottes concaves et irrégulières dans leur concavité (Pl. IV, fig. 36, 37 et 38).

V. — Saccharomyces membranæfaciens (Hansen)

Ce Saccharomyces a été découvert par Hansen dans les exsudations gommeuses des racines d'orme. Il se rapproche des Mycodermes par ses propriétés physiologiques et par sa propriété de former à la surface du moût de bière un voile gris, luxuriant, composé principalement de cellules allongées en forme de boudins. Mais il se rapproche des levures de Hansen par sa grande richesse en endospores qui se développent non seulement sur les cultures sur

plâtre, mais aussi dans les voiles. Les asques sont en général allongés, avec deux spores sphériques ou ovales mesurant 4, 5 μ dans le plus long diamètre.

Développement végétatif. — Cette levure se présente, dans ses premières phases de développement, sous forme de cellules longues, à protoplasme homogène, creusé ordinairement de deux vacuoles, qui renferment un grand nombre de corpuscules métachromatiques offrant souvent par leur ensemble des aspects réticulés ; dans la suite, ces corpuscules métachromatiques se fusionnent, grossissent et apparaissent sous forme de deux ou trois sphérules placées au centre de chaque vacuoles.

Le noyau est généralement au centre de la cellule. Parfois il se trouve comprimé entre les deux vacuoles et prend une forme discoïdale, mais très souvent il est complètement séparé de celles-ci.

Ce noyau se rapproche beaucoup par sa dimension et sa structure de celui que nous avons observé dans le *S. anomalus.* Il est formé d'un *chromoblaste* entouré d'un *nucléohyaloplasme incolore*, limité par une *membrane* que, seules, les meilleures préparations permettent de distinguer (Pl. IV, fig. 39, 40 et 41).

La division de ce noyau se fait aussi par un

partage transversal du chromoblaste en deux parties égales.

Au bout de vingt-quatre heures, on voit se former une ou deux vacuoles glycogéniques occupant des positions variables dans la cellule.

Sporulation. — Au moment de la sporulation, le protoplasme se vacuolise entièrement et les cellules apparaissent formées d'un groupe de vacuoles à corpuscules métachromatiques placé au milieu de la cellule et deux groupes polaires de vacuoles glycogéniques.

A un stade plus avancé, les corpuscules métachromatiques diminuent de nombre et les vacuoles qui les contiennent prennent, avec les matières colorantes, une *coloration rouge* indiquant leur *dissolution* (Pl. XII, fig. 44, 45 et 46).

La division du noyau est difficile à étudier, étant donnée la petite taille des cellules. Elle paraît toutefois s'effectuer comme dans les cas précédents. Les spores naissent au milieu de la cellule et se forment par le procédé habituel (Pl. IV, fig. 42 et 43).

VI. — Résumé

Nous avons observé dans ce chapitre un certain nombre de levures *(S. Pastorianus,*

S. ellipsoïdeus, S. subcutaneus tumefaciens, S. membranœfaciens, S. anomalus), et nous avons retrouvé chez ces levures une structure correspondante à celle que nous avons décrite chez le *S. cerevisiœ.*

On y distingue en effet un noyau, formé tantôt d'un *nucléoplasme*, d'un *nucléole* et de *grains de chromatine,* tantôt d'un *nucléoplasme* et d'un *chromoblaste*, et des vacuoles renfermant des corpuscules métachromatiques en plus ou moins grande abondance. Le glycogène se répartit dans les vacuoles distinctes.

La division du noyau s'effectue, soit par *amitose typique*, soit par un partage transversal du chromoblaste, analogue à celui que nous avons décrit chez les moisissures.

Les phénomènes de sporulation s'accomplissent de la même manière que chez le *S. cerevisiœ* et commencent toujours par une vacuolisation du protoplasme suivie d'une *dissolution des corpuscules métachromatiques* dans l'intérieur des vacuoles qui les renferment.

CHAPITRE V

Saccharomyces Ludwigii (Hansen)

Cette espèce fut rencontrée par Ludwig avec un certain nombre de microorganismes dans les suintements muqueux de chênes vivants et d'autres arbres. Elle fut considérée par cet observateur comme une forme levure de l'*Oïdium Magniusii*, qu'il avait découvert sur les mêmes produits.

Hansen réussit à l'isoler et à démontrer son indépendance de l'*O. Magniusii*.

Les cellules du *S. Ludwigii* sont très variables de dimensions et de formes; elles peuvent être elliptiques, allongées, en forme de bouteille ou même de citron.

Les spores se forment très facilement et même dans les voiles. Elles sont d'ordinaire au nombre de 2 à 4 par cellule, parfois de 6 à 8. Elles pos-

sèdent un diamètre variant de 3 à 4 μ. Leur germination présente un caractère spécial que nous étudierons dans la suite.

Hansen a signalé dans cette même espèce un caractère curieux que nous retrouvons d'une manière plus accusée encore chez les Schizosaccharomyces : dans une série de cultures de cette espèce, il est arrivé à séparer des cellules qui fournissent facilement des spores de celles qui n'en donnent pas et à isoler deux variétés : l'une conserve sa facilité à fournir des spores ; l'autre la perd et ne la retrouve pas même lorsqu'on la reporte dans les conditions les plus favorables à la formation des spores.

La variété asporogène possède des cellules très allongées, formant des rudiments de mycélium ayant une certaine ressemblance avec un Oïdium.

I. — Structure et développement végétatif

Cultivé dans le liquide Mayer, le *S. Ludwigii* présente un protoplasme homogène et un certain nombre de petites vacuoles, placées au centre de la cellule, qui quelquefois se multiplient, augmentent leur volume, et donnent au protoplasme un aspect alvéolaire. Mais dans la plupart des cas, elles se fusionnent très vite

pour constituer une unique vacuole occupant toute la partie médiane de la cellule. Ces vacuoles renferment, comme chez les autres levures, des corpuscules métachromatiques de nombre et de dimensions très variables : ils sont d'abord très petits et très nombreux, et présentent par leur ensemble l'aspect d'un fin réticulum; dans la suite ils se fusionnent pour former de grosses sphérules (Pl. XI, fig. de 15 à 21).

Le noyau se différencie difficilement. Il est ordinairement assez petit par rapport à la cellule et se montre sous l'aspect d'une masse sphérique et homogène, d'environ 1 μ de diamètre, située soit au centre, soit sur un côté de la cellule, et souvent proche de la vacuole. Rarement on aperçoit les détails de sa structure. Cependant on réussit quelquefois à mettre en évidence un *chromoblaste*, un *nucléohyaloplasme incolore* et une *membrane délimitante*.

Ce noyau est toujours unique dans chaque cellule, même dans les voiles.

Le bourgeonnement s'effectue par un mode un peu différent de celui des autres levures; la cellule mère émet à l'une de ses extrémités une proéminence assez large, qui grossit et qui ayant acquis un certain développement, se sépare du reste de la cellule par un léger étranglement et par la formation d'une cloison séparatrice. Il y a là, comme l'a fait remarquer

Schiœnning, un mode de division intermédiaire entre le bourgeonnement typique des levures ordinaires et le cloisonnement des Schizosaccharomyces. En dehors de cette distinction morphologique, les phénomènes histologiques ne diffèrent pas de ceux qu'on observe dans le bourgeonnement ordinaire des Saccharomyces. Une partie de la vacuole pénètre dans le bourgeon avec un certain nombre de corpuscules métachromatiques et la vacuole se sépare ensuite de la cellule mère. Le noyau accompagne ou suit ce phénomène. Sa division se produit indifféremment selon les deux modes que nous avons rencontrés jusqu'ici : tantôt il s'allonge, introduit l'une de ses extrémités dans le jeune bourgeon, s'étrangle et se coupe à son milieu, se séparant ainsi en deux portions dont l'une devient le noyau de la cellule fille ; tantôt il se scinde transversalement en deux moitiés ayant quelquefois la forme de demi-disques, entourés d'abord d'une même gaine nucléoplasmique qui se sépare ensuite (Pl. IV, fig. de 44 à 47 et Pl. IX, fig. de 12 à 14). Seules les meilleures préparations permettent de se rendre compte de ce dernier mode.

Janssens et Leblanc ont au contraire décrit chez cette levure une division plus compliquée, avec fuseau achromatique et plaque équatoriale, qui serait d'après eux une cinèse rudimentaire.

Il est probable que ces auteurs ont observé à la fois la division du noyau et celle de la vacuole ; cette dernière, en effet, donne lieu, lorsque les corpuscules métachromatiques sont colorés, à des figures qui rappellent un peu la karyokinèse ; ils auraient donc confondu ces deux phénomènes.

Au cours du développement on voit naître dans le protoplasme un certain nombre de vacuoles où vient se localiser le glycogène, jusqu'alors disséminé dans le protoplasme sous forme de petites taches. Le plus souvent, il se forme deux vacuoles occupant les deux pôles de la cellule.

A cet état, la cellule est donc constituée d'*une vacuole centrale à corpuscules métachromatiques,* d'un *noyau* presque toujours en contact avec cette vacuole et de *deux vacuoles glycogéniques* souvent très grosses situées aux deux extrémités de la cellule. Nulle part ailleurs, cette localisation du glycogène et des corpuscules métachromatiques dans des vacuoles distinctes ne s'observe aussi bien ; elle paraît tenir à une spécialisation dans les fonctions physiologiques du protoplasme. Toutefois, lorsque le glycogène est très abondant dans les cellules, il peut en pénétrer un peu dans la vacuole centrale, mais dans ce cas il n'y existe jamais qu'en très faible quantité et ordi-

nairement sous forme de petits granules. A l'état frais la vacuole centrale se distingue très nettement par sa forte réfringence, tandis que les vacuoles glycogéniques faiblement réfringentes s'aperçoivent plus difficilement. Les matières colorantes (hématoxyline de Heidenhain, hémalun, violet de gentiane, bleu de méthylène, vert de méthyl) laissent la vacuole centrale absolument incolore, alors que les vacuoles polaires prennent une teinte diffuse avec parfois quelques petites granulations faiblement colorées, analogues à celles que nous avons signalées à propos du *S. cerevisiæ*.

Les doubles colorations au vert de méthyle et à l'iodo-iodure de potassium donnent de très bonnes préparations (Pl. XI, fig. 22 et 23).

Cette conformation qui est la plus ordinaire est cependant sujette à quelques variations. C'est ainsi qu'il ne se forme quelquefois qu'une seule vacuole à l'un des pôles de la cellule. Dans le cas où la cellule a une forme presque sphérique, il peut naître une ou plusieurs vacuoles glycogéniques à un endroit quelconque. Lorsque le glycogène est en très grande quantité, les deux vacuoles polaires sont capables de prendre des dimensions considérables et les vacuoles à corpuscules métachromatiques se trouvent alors très réduites, comprimées de part et d'autre par ces deux vacuoles glycogéniques.

Parfois aussi dans les cellules âgées toutes ces vacuoles se fusionnent pour constituer une unique vacuole occupant toute la cellule, contenant un peu de glycogène et quelques corpuscules métachromatiques localisés tout autour de la vacuole. C'est généralement ce qui se produit, en même temps que le protoplasme se transforme en globules d'huile, lorsque les cellules commencent à entrer en dégénérescence.

Souvent enfin les corpuscules métachromatiques au lieu de se localiser uniquement dans une vacuole centrale, peuvent naître à différents endroits de la cellule et notamment aux deux pôles et on voit parfois des vacuoles renfermant ces corpuscules alterner avec des vacuoles à glycogène. Cela s'observe surtout dans les cellules très allongées et dans les voiles. D'ailleurs il est inutile d'insister plus longtemps sur ces variations purement accidentelles et qui n'ont aucune importance (1) (Pl. XI, fig. 17 et 21).

Cette structure se conserve généralement pendant très longtemps et contrairement à ce qu'on observe chez le *S. cerevisiæ*, le glycogène paraît subsister souvent même après la fermentation.

(1) Duclaux (*Traité de Microb.*, t. I, p. 132 et t. III, p. 125) attribue les différents aspects que montre le protoplasme des levures à des phénomènes de plasmolyses temporaires. Ce seraient des phénomènes de coagulation qui conduiraient à des figures diverses suivant les circonstances. Il serait difficile d'en faire des détails anatomiques.

II. — Sporulation

Le *S. Ludwigii* offre une très grande facilité pour l'étude histologique de la sporulation, soit par les dimensions relativement grandes de ses cellules, soit par la disposition de ses spores; celles-ci, au lieu de naître dans un même endroit de la cellule, se forment presque toujours à ses deux pôles et permettent de se rendre mieux compte de leur mode de formation.

Les spores se produisent très facilement dans les cultures sur tranches de carotte. La multiplication y est d'abord assez abondante et la sporulation commence au bout de deux à trois jours. Le développement y suit une marche semblable à celle que nous venons d'observer dans le liquide Mayer.

Phénomènes protoplasmiques. — La levure, primitivement formée d'un protoplasme homogène avec une vacuole centrale renfermant un certain nombre de corpuscules métachromatiques, se remplit peu à peu de glycogène qui se localise dans l'intérieur de deux vacuoles polaires (Pl. XI, fig. 24). C'est à ce stade qu'on observe le début des phénomènes protoplasmiques, qui précèdent la sporulation. Le noyau reste unique et il n'existe pas de conjugaison nucléaire. Les corpuscules métachromatiques et

le glycogène deviennent très abondants et les vacuoles se divisent en un très grand nombre de plus petites, mais le contenu ne se modifie pas; il existe toujours deux catégories de vacuoles, les unes contenant des corpuscules métachromatiques, les autres étant imprégnées de glycogène. Les premières sont au nombre de cinq à six, quelquefois plus; elles sont ordinairement disposées au milieu de la cellule, quelquefois à l'une de ses extrémités, rarement elles constituent plusieurs groupes disséminés à certains endroits de la cellule. Les vacuoles glycogéniques restent localisées aux deux pôles de la cellule.

Le noyau est toujours en contact avec les vacuoles à corpuscules métachromatiques dont l'ensemble représente sans doute les granulations signalées par Wager autour du noyau, au début de la sporulation ; rarement il occupe le centre de la cellule et se trouve entouré par les vacuoles, qui parfois empêchent de le distinguer; mais le plus souvent, il est sur l'un des côtés, accolé à la membrane.

Les vacuoles centrales sont d'abord remplies d'une quantité considérable de corpuscules métachromatiques réunis les uns à côté des autres, débordant quelquefois sur le protoplasme, et masquant le contour du réseau très fin qui les entoure. Les vacuoles glycogéniques

sont de leur côté très mal délimitées, remplies d'un contenu qui prend vis-à-vis des colorants une teinte diffuse un peu plus claire seulement que le protoplasme qui les entoure. L'interprétation de cette structure n'est pas toujours facile ; néanmoins on s'en rend très distinctement compte lorsqu'on colore soit au bleu de méthylène, ou à l'hémalun, et qu'on lave très longtemps de façon à décolorer en partie les corpuscules métachromatiques : on distingue dans ces conditions une très grande quantité de petites vacuoles de formes à peu près régulières, alvéolaires, limitées par des mailles protoplasmiques très fines.

Il existe donc à ce moment une structure d'*aspect alvéolaire*, présentant d'une part des vacuoles à corpuscules métachromatiques localisées au centre, et d'autre part des vacuoles à glycogène. On ne peut moins faire ici encore que de rapprocher cette structure de celle observée par certains auteurs chez les bactéries avec un corps central alvéolaire contenant une certaine quantité de corpuscules métachromatiques et une zone corticale également alvéolaire, mais ordinairement dépourvue de corpuscules métachromatiques (Zacharias, Palla, Nadson, Bütschli).

Dissolution des corpuscules métachromatiques. — On assiste, à un stade un peu plus

avancé, à des phénomènes de *dissolution des corpuscules métachromatiques* analogues à ceux que nous avons constatés chez les levures précédemment étudiées et qui expliquent que Wager ait décrit une disparition de ses *grains de chromatine* qui selon lui étaient absorbés par le nucléole.

La plupart de ces corpuscules métachromatiques diminuent de taille et de nombre et n'apparaissent plus guère que sous forme de très petites ponctuations, surtout localisées à la périphérie des vacuoles, tandis que toutes les vacuoles qui les renfermaient se colorent uniformément en rouge clair avec les matières colorantes qui donnaient à ces corps leur couleur spécifique. Dans aucune levure, cette dissolution n'est aussi caractéristique, et il est particulièrement intéressant de retrouver toujours ce même phénomène précédant la formation des spores dans toutes les levures que nous avons étudiées. Il y a donc beaucoup de raisons pour penser que la substance ainsi dissoute est absorbée en même temps que le glycogène, avec lequel elle est toujours associée, et sert pour la construction des spores. La planche XI, fig. de 25 à 26 et la planche XII, fig. de 1 à 25 montrent tous les stades de dissolution de ces corpuscules métachromatiques qui ont été suivis très soigneusement et colorés avec le bleu de méthylène.

Phénomènes nucléaires. — A ce moment la cellule se clarifie par suite de la dissolution des corpuscules métachromatiques, et le réseau protoplasmique se laisse mieux distinguer. Le noyau se différencie très visiblement, même avec le bleu de méthylène (Pl. XI, fig. de 25 à 42). Il conserve sa position soit centrale soit périphérique et possède toujours sa forme sphérique et homogène, mais il ne tarde pas à s'entourer d'une zone protoplasmique à contour plus ou moins irrégulier, destinée à former les spores et que nous pouvons appeler *plasme sporogène*.

Cette condensation paraît se produire par un épaississement et un resserrement des mailles du protoplasme au voisinage du noyau. Les mailles du protoplasme du reste de la cellule deviennent alors très ténues et il est souvent difficile de les apercevoir. A l'état frais, la cellule ne montre qu'un énorme espace hyalin et un îlot protoplasmique placé sur un des côtés de la cellule et qui représente le noyau et la condensation du protoplasme. On ne distingue jamais le réseau protoplasmique et l'on s'explique ainsi les observations de Zalewsky. Cet auteur ayant suivi en gouttelette pendante le processus de la sporulation chez le *S. ellipsoïdeus*, remarquait d'abord une vacuolisation du protoplasme et ensuite une fusion

des vacuoles formant une unique vacuole centrale, qui occupait toute la cellule ; le protoplasme, réduit à une mince couche pariétale, s'épaississait à certains endroits pour donner naissance aux spores.

Divisions nucléaires. — C'est à ce stade que commence la première division nucléaire. Le noyau se trouve donc au milieu de la cellule ou plus fréquemment appuyé contre un côté de la membrane et se montre comme une masse sphérique, entourée d'une zone de protoplasme possédant une vive affinité pour les colorants.

Pour étudier cette division qui présente de sérieuses difficultés d'observation, nous avons essayé un très grand nombre de procédés, sans parvenir à en trouver un seul qui puisse nous renseigner suffisamment sur le mode suivant lequel elle s'accomplit. Les méthodes à la nigrosine et au carmin ou au violet de gentiane employées par Wager nous ont fourni des résultats intéressants, mais nous avons obtenu de meilleures préparations avec l'hématoxyline de Heidenhain, l'hémalun et le bleu de méthylène ou le bleu polychrome, les deux premiers s'employaient après fixation à l'acide picrique, les deux autres, permettant d'observer à la fois le noyau et les corpuscules

métachromatiques, étaient utilisés sur des cellules fixées à l'alcool à 95°.

Le noyau commence par se diviser en deux masses plus ou moins régulières, très colorées et entourées d'une même zône de plasme sporogène. A un stade ultérieur, on voit les deux noyaux ainsi formés et toujours réunis par du plasme sporogène s'éloigner et émigrer dans un endroit variable de la cellule. Le plus souvent ils se dirigent aux deux pôles, en parcourant la cellule soit en oblique, soit en longueur s'ils sont primitivement placés au centre, ou souvent aussi en restant accolés à la membrane et en suivant son contour (Pl. V, fig. de 14 à 33).

On distingue donc deux noyaux occupant chacun l'un des pôles, entourés d'une zone de plasme sporogène à contours irréguliers et réunis l'un à l'autre par un mince filet de ce même plasme. Arrivés à ces deux extrémités de la cellule, les deux noyaux recommencent aussitôt à se diviser et l'on voit alors à chaque pôle deux masses nucléaires entourées de plasme sporogène, d'abord très rapprochées l'une de l'autre et qui ensuite s'écartent légèrement; c'est à ce nombre que s'arrête ordinairement la division, le chiffre typique des spores étant de quatre. Aussitôt après apparaissent les premières ébauches des spores. Ce type de division est le

plus général ; il existe cependant quelques variations. Très souvent le noyau accolé à l'un des côtés de la membrane donne en se divisant deux noyaux fils, dont l'un conserve sa position primitive et dont l'autre traverse la cellule pour se placer à l'extrémité opposée, et c'est alors sur ces deux extrémités latérales que s'effectue la seconde division et la naissance des spores. Exceptionnellement les trois divisions s'accomplissent sur place et comme dans les levures précédemment étudiées, les quatre noyaux fils peuvent rester très près l'un de l'autre entourés d'une même gaine de plasme sporogène (Pl. V, fig. 27); les spores se produisent ainsi sur un même côté de la cellule et dans un espace très resserré. On ne remarque que très rarement des figures de la seconde division se croisant, comme les a décrites Wager.

Dans les préparations colorées au bleu de méthylène ou au bleu polychrome, les mailles du protoplasme limitant les vacuoles apparaissent très fines avec une teinte bleu pâle; le plasme sporogène forme au début de la division une masse irrégulière, accolée à la membrane et reliée aux mailles protoplasmiques sur son côté libre par de fins trabécules ; il est très coloré et se détache nettement du reste de la cellule. Le noyau s'aperçoit assez confusément comme une masse un peu plus

fortement teinte. Tout autour du plasme sporogène et du noyau, les vacuoles prennent une teinte uniformément rouge avec quelques corpuscules métachromatiques colorés en rouge intense ou violet. Plus tard on remarque à chaque extrémité de la cellule une zone de plasme sporogène contenant l'une et l'autre un noyau et réunies par un mince filet protoplasmique, le tout coloré en bleu sombre; quelques corpuscules métachromatiques sont adhérents aux deux masses de plasme sporogène et quelquefois au trabécule qui les unit (Pl. XI, fig. de 43 à 46 et Pl. XII; fig. de 1 à 4). Lorsqu'on examine les cellules à l'état frais, on observe, en effet, une cellule d'aspect vacuolaire, hyaline, contenant à ses deux pôles deux masses plasmiques peu visibles et réunies par un trait d'union mais entourées de granules réfringents, ce qui avait fait penser à certains auteurs que les spores naissaient par condensation de ces granules (de Bary). En réalité ce ne sont que des restes de corpuscules métachromatiques non dissous, qui viennent se rassembler autour des spores.

Dans des stades plus avancés chaque masse plasmique des deux extrémités laisse apercevoir deux noyaux très rapprochés l'un de l'autre et provenant de la deuxième division.

Les colorations au violet de gentiane et à l'hémalun donnent des résultats très sem-

blables. Cependant l'hémalun a l'avantage de colorer plus distinctement les mailles du protoplasme limitant les vacuoles et donne parfois de très belles structures alvéolaires (Pl. V, fig. de 37 à 41).

Avec l'hématoxyline de Heidenhain, tout l'ensemble de la cellule reste à peu près incolore, on distingue seulement çà et là quelques fragments des mailles protoplasmiques, mais le plasme sporogène se colore intensivement et d'une manière uniforme (Pl. IV, fig. de 48 à 50 et Pl. V, fig. de 1 à 13). Ce n'est que lorsqu'on a soumis les préparations à une longue décoloration à l'alun de fer que l'on aperçoit les noyaux (Pl. V, fig. de 14 à 33). Le plasme sporogène prend alors une teinte grise et les noyaux se colorent en noir intense et se distinguent mieux qu'avec tous les autres colorants.

Les figures que nous représentons s'écartent un peu de celles de Bouin qui paraît n'avoir vu qu'une partie du phénomène. Elles ressemblent beaucoup, au contraire, à celles des autres observateurs (Buscalioni, Janssens et Leblanc, Wager). Ces auteurs envisagent tout l'ensemble de ce que nous avons désigné sous le nom de plasme sporogène comme constituant une figure de division nucléaire.

Buscalioni y voit un mode de division rappelant par certains côtés la karyokinèse.

Janssens et Leblanc précisent davantage et décrivent une karyokinèse avec deux masses chromatiques (les deux masses polaires du plasme sporogène) dont on ne distingue pas les chromosomes, réunies par un fuseau achromatique avec parfois une plaque équatoriale.

Wager admet également l'hypothèse d'une division voisine de la karyokinèse avec deux masses chromatiques reliées par un fuseau achromatique. Il distingue même quelquefois un groupement de petits granules aux deux extrémités de la figure : ce seraient les chromosomes.

Notre opinion est un peu différente de celle de ces auteurs : nous ne pensons pas que l'on doive rapporter tout ce qui est décrit par eux à une division nucléaire. Il est extrêmement difficile de se rendre compte de ces phénomènes et il nous paraît impossible d'en donner une interprétation aussi précise. Les figures observées sont quelquefois volumineuses, de beaucoup plus grandes que le noyau primitif et d'une dimension surtout exagérée lorsqu'on considère l'extrême petitesse du noyau des spores et la petite taille de celles-ci. De plus, il existe une certaine irrégularité dans le prétendu fuseau ; très souvent on y distingue des travées latérales ; elles montrent simplement que le plasme sporogène est toujours en communica-

tion avec les mailles des vacuoles et c'est probablement ce que Janssens et Leblanc ont décrit à tort comme une plaque équatoriale.

D'ailleurs il faudrait admettre que le fuseau achromatique puisse persister pendant la seconde division et même après la formation des spores, car, ainsi que nous le verrons, les quatre spores déjà formées et enveloppées de leur membrane restent souvent réunies pendant quelque temps par ce trait d'union plasmique; souvent aussi cette bride plasmique se brise à son milieu et les deux groupes de spores possèdent chacun une sorte de prolongement dirigé vers le centre. Néanmoins, on rencontre certains cas où le trabécule plasmique qui relie les deux masses nucléaires présente une apparence de striations et offre un peu l'aspect d'un fuseau achromatique. D'autre part, il existe certaines figures où les noyaux ont une forme irrégulière et granuleuse qui pourrait peut-être bien indiquer une karyokinèse. On pourrait donc avoir une division indirecte et une partie de ces figures devrait peut-être être considérée comme inhérente à cette division. Toutefois il est certain que s'il y a vraiment une karyokinèse, il existe en même temps du plasme sporogène et un fuseau achromatique plus ou moins confondus dans ces stades.

Ainsi dans cette levure de même que dans

toutes les précédentes, on aurait une division simultanée du noyau et d'une partie condensée de plasme sporogène aggloméré autour du noyau qui peut-être contiendrait aussi un fuseau achromatique. Il est donc impossible de se faire une idée exacte du mode suivant lequel s'effectuent ces divisions nucléaires.

Formation des spores. — Au moment où vont se former les spores, la cellule est donc traversée dans sa longueur par une fine traînée de protoplasme, réunissant deux masses de plasme sporogène situées à chacun des pôles et contenant chacune deux noyaux très rapprochés l'un de l'autre. Le trabécule qui unit ces deux masses subsiste ou il se brise à sa partie médiane et les deux lambeaux se réunissent aux deux masses de plasme sporogène, et l'on voit bientôt apparaître les premières ébauches des spores par une délimitation d'une petite boule plasmique dont le noyau occupe le bord. A l'opposé il n'y a pas de limite arrêtée. Toute la partie qui se trouve à côté du noyau prend alors un contour régulier et une teinte beaucoup plus sombre, le contour de la partie opposée au noyau présente au contraire un aspect plus ou moins dentelé. C'est peut-être là l'origine d'une membrane plasmique très fine. Les ébauches de spores ont ainsi l'aspect de

calottes (Pl. V, fig. 7, 9, 10, 11, 12, 13, 26, 32, 34, 35 et Pl. XII, fig. de 5 à 7). Chacune de ces masses sporogènes prend ensuite un contour régulier d'un bout à l'autre, devient sphérique et s'entoure d'une zone hyaline qui la distingue nettement du reste de la cellule, et qui marque sans doute le début de la membrane cellulosique, car bientôt après celle-ci apparaît et se substitue à la zone hyaline. Puis on voit les spores constituées d'un très petit noyau sphérique accolé à un des côtés de la membrane, d'où partent quelques rayons protoplasmiques. Les spores d'abord très petites restent disposées par paires aux deux pôles de la cellule. Elles sont parfois entourées d'un reste de plasme sporogène et les deux groupes de spores restent souvent réunis pendant quelque temps par le trabécule plasmique qui reliait le plasme sporogène.

La formation des spores et leur délimitation près des noyaux par une zone sombre qui ne se ferme que tardivement à l'extrémité opposée, fait que nous avons constaté chez toutes les levures, et qui n'avait jamais été remarqué, mérite un intérêt particulier, car elle offre des figures qui pourraient rappeler les dessins représentés par Harper chez les Ascomycètes supérieurs. Cet auteur a décrit en effet un kinoplasme, qui en se recourbant autour du

noyau délimite la spore et l'enveloppe d'une membrane plasmique ; chez les Ascomycètes de même que chez nos levures, la spore une fois délimitée s'entoure d'une zone hyaline qui précède la formation de la membrane cellulosique. Peut-être existerait-il dans les deux cas des processus analogues dont la petite taille des levures ne permettrait pas d'apercevoir les détails.

Les spores grossissent peu à peu en absorbant l'épiplasme. Celui-ci se désorganise, les vacuoles parfois se fusionnent, les brides protoplasmiques se résorbent et il ne reste plus qu'un liquide cellulaire contenant quelques corpuscules métachromatiques en suspension dans un liquide qui se colore uniformément en rouge pâle avec la plupart des matières colorantes, produit de la dissolution de ces corpuscules et qui renferme également une grande quantité de glycogène (Pl. XII, fig. de 8 à 25).

Le reste des corpuscules métachromatiques s'agglomère autour des spores et forme quelquefois même autour d'elles une sorte de muraille qui par son irrégularité donne parfois l'illusion d'une membrane épineuse.

Avec le bleu polychrome, on obtient quelquefois une coloration violette des spores comme si elles étaient imprégnées du contenu rouge de l'épiplasme.

Elles sont attachées par groupes de deux par une lame protoplasmique qui se contracte au fur et à mesure que les spores grossissent. Cette lame paraît être formée du reste du plasme sporogène, mais elle contient aussi des corpuscules métachromatiques car elle se colore souvent en rouge par l'hémalun.

Les spores possèdent dans leur début une forte colorabilité, qui disparaît lorsqu'elles ont atteint un certain développement. Elles deviennent alors très réfringentes et se colorent beaucoup plus difficilement, cependant elles continuent toujours à fixer énergiquement l'hématoxyline au fer. Doit-on attribuer la perte du pouvoir de coloration à l'épaississement de la membrane ou à une transformation chimique de la substance protoplasmique ? Il semble que les deux causes puissent entrer en ligne de compte, néanmoins il paraîtrait plutôt que cette absence de coloration tienne à un état particulier du protoplasme, car le noyau et les corpuscules métachromatiques continuent à se colorer, lorsque le protoplasme ne fixe plus la couleur ; d'autre part les coupes à la paraffine lorsqu'elles sectionnent les spores ne rendent pas plus facile cette coloration, qui d'ailleurs persiste toujours avec le procédé d'Heidenhain. C'est aussi l'explication à laquelle se rallient la plupart des

observateurs qui ont étudié les bactéries où l'on constate des faits analogues.

Une fois mûre, la spore est constituée d'un petit noyau homogène, accolé à la membrane et d'un protoplasme rayonnant autour de lui en délimitant des vacuoles (Pl. V, fig. 42).

Les vacuoles renferment du glycogène, et l'on aperçoit quelques corpuscules métachromatiques placés dans les rayons du protoplasme. Ce glycogène et ces corpuscules augmentent au fur et à mesure que les spores grossissent. L'épiplasme paraît alors avoir été presque entièrement absorbé et s'il en reste quelques parties, il se transforme en huile et reste inutilisé.

Le nombre des spores est *typiquement de quatre*. Néanmoins il peut varier, soit par réduction due à l'avortement d'un certain nombre d'ébauches de spores, soit au contraire par augmentation indéterminée de ce nombre : c'est ce qui peut se produire dans les cellules trop allongées des voiles. Mais ce sont des cas rares et il existe une certaine fixité dans le nombre des spores, que nous n'avions pas remarquée chez les levures précédentes, et qui n'avait pas encore été signalée pour cette levure. Nous retrouverons ce même caractère chez les Schizosaccharomyces. Ces faits, joints au mode de bourgeonnement du *S. Ludwigii*

et à un certain nombre d'autres caractères, établissent donc un lien indiscutable entre cette levure et les Schizosaccharomyces que nous étudierons dans le chapitre suivant.

Résumé. — En résumé, les phénomènes histologiques de la sporulation suivent la marche que voici : le protoplasme se *vacuolise complètement,* chacune des vacuoles contient soit du glycogène, soit des corpuscules métachromatiques. L'aspect de la cellule rappelle alors les structures décrites par Bütschli. Le noyau est toujours en contact avec les vacuoles à corpuscules métachromatiques. Il est unique dans chaque cellule et ne subit aucune modification avant la division nécessaire pour distribuer un noyau à chaque spore. On n'observe donc jamais les phénomènes de conjugaison nucléaire signalés par Janssens et Leblanc.

Dans un stade suivant les corpuscules métachromatiques paraissent *se dissoudre dans l'intérieur des vacuoles* qui les renfermaient et qui prennent alors une teinte uniformément rouge avec un certain nombre de colorants. A ce moment le noyau placé sur un des côtés de la cellule s'entoure d'une zone de protoplasme qui se condense autour de lui, et qui constitue le *plasme sporogène;* il se divise en deux noyaux fils qui émigrent généralement aux

deux pôles de la cellule entraînant avec eux une portion de plasme sporogène. Les deux masses de plasme sporogène, contenant chacune un noyau et placées aux deux extrémités de la cellule, restent souvent reliées l'une à l'autre par un *mince filet plasmique* (fuseau équatorial de Janssens et Leblanc et de Wager) et dont une partie représente peut-être un fuseau équatorial.

La seconde division se produit perpendiculairément à l'axe de la cellule et immédiatement après commencent à naître les spores par un procédé curieux que peut-être pourrait-on rapprocher de ce qu'a figuré Harper chez certains Ascomycètes. La division nucléaire pourrait être une *karyokinèse*, mais nous ne pouvons dans aucun cas nous en faire une idée suffisamment précise.

Les spores, d'abord très petites, grossissent peu à peu en absorbant l'épiplasme et finissent par occuper la cellule tout entière. Les corpuscules métachromatiques et leur substance à l'état de dissolution sont absorbés en totalité par la spore en même temps que le glycogène. Il paraît donc très vraisemblable que ce sont bien des *matières de réserve* au même titre que le glycogène.

Les spores contiennent un noyau accolé à la membrane d'où partent un certain nombre de

rayons protoplasmiques limitant des vacuoles et qui contiennent quelques corpuscules métachromatiques. Les vacuoles renferment du glycogène.

On voit donc que dans leur ensemble ces phénomènes ressemblent par plus d'un côté à ce qu'on a décrit chez les Ascomycètes, chez lesquels se différencie également un plasme sporogène très dense (le reste étant vacuolaire), dans lequel s'effectuent la division nucléaire et la formation des spores qui paraît ressembler à ce que nous avons signalé chez les levures. L'épiplasme est aussi chargé de glycogène et nous avons observé chez celui de certaines Pezizes une quantité considérable de corpuscules métachromatiques qui évidemment doivent entrer pour une large part dans sa constitution (1). Enfin la tendance que manifeste le *S. Ludwigii* à la fixité du nombre des spores constitue encore un lien de parenté entre cette forme de reproduction et l'asque typique..

Enfin la manière dont se comportent les corpuscules métachromatiques mérite encore ici toute notre attention ; elle confirme notre opinion que ce sont des matières de réserve. Déjà Raum avait signalé leur importance dans

(1) La présence de corpuscules métachromatiques dans l'épiplasme des Ascomycètes n'avait pas été signalée jusqu'ici.

la formation des spores chez les levures et Ernst chez les bactéries, et un certain nombre d'auteurs avaient été amenés à les considérer comme des produits de réserve (Fischer, Lauterborn, Matruchot et Molliard).

Bunge a montré, il est vrai, que contrairement à ce que pensait Ernst, les spores naissaient en dehors de ces corpuscules qui, au contraire, subsistaient dans le protoplasme non employé à la formation de ces spores. Mais, s'ils n'entrent pas dans le procès de formation des spores, au moins peuvent-ils avoir un rôle de nutrition et nos observations donnent un intérêt spécial à ces considérations.

III. — Germination des spores

Hansen a observé dans les spores de *S. Ludwigii*, un mode de germination tout à fait particulier. Tandis que chez les autres levures : *S. cerevisiæ*, *S. Pastorianus*, *S. ellipsoïdeus*, *S. anomalus*, les spores bourgeonnent directement en des points quelconques comme les cellules végétatives, on remarque au contraire chez le *S. Ludwigii* la formation d'une seule proéminence s'allongeant en un petit tube ger-

minatif qui ayant atteint une certaine dimension se cloisonne à sa partie terminale pour donner de nouvelles cellules. Les spores ne produisent donc pas immédiatement de nouvelles cellules comme chez les autres Saccharomyces, mais donnent naissance à une formation intermédiaire à laquelle Hansen a donné le nom de *promycélium*. De plus, les cellules dérivant de ce promycélium naissent par formation de cloison transversale et non par bourgeonnement.

En outre, dans la majeure partie des cas, la formation de ce promycélium est le résultat de la *fusion de deux spores*. Les spores, le plus souvent au nombre de quatre dans chaque asque et disposées par groupes de deux, restent soudées même après la rupture de la paroi de l'asque, par une sorte de lame plasmique dont nous avons parlé antérieurement.

Chacune des deux spores ainsi adhérentes émet une petite proéminence; les deux proéminences ainsi formées se rejoignent, se soudent l'une à l'autre par résorption de la membrane séparatrice et constituent un seul tube germinatif qui devient le promycélium.

Hansen a constaté que ces fusions étaient le cas normal dans la germination des spores jeunes et fraîches; au contraire les spores âgées manifesteraient une tendance à germer isolément.

Il compare ces phénomènes aux pseudo-conjugaisons observées par Tulasne chez divers champignons, mais il ne se prononce pas d'une façon précise sur leur signification biologique. Cette fusion de deux spores servirait, d'après lui, « à mettre les spores en état de développer un nombre relativement plus grand de cellules de levures ; on ne saurait le considérer comme un véritable acte sexuel. »

Nous avons cherché à suivre ces phénomènes pour nous rendre compte du rôle du noyau en pareil cas. Malheureusement depuis plus de six mois que nous observons la germination des spores de ce Saccharomyces, nous n'avons jamais obtenu de fusion. Nous avons employé le plus strictement possible les méthodes indiquées par Hansen et nous nous sommes servi d'un grand nombre de milieux de cultures dont nous avons fait varier les conditions. Bien qu'*a priori* ces fusions ne paraissent pas présenter les caractères de phénomènes sexuels, il eût été cependant intéressant de rechercher comment se comportait le noyau.

La germination s'est effectuée d'une manière analogue à celle qu'avait décrite Hansen, mais chacune des spores germait isolément et chacune produisait un promycélium ; tantôt les promycéliums d'un même groupe de spores naissaient en sens inverse, quelque-

fois ils se dirigeaient dans le même plan et en sens parallèle, d'autres fois ils se rapprochaient l'un de l'autre comme s'ils allaient se rejoindre, et se croisaient, mais sans jamais se souder l'un à l'autre.

Il faut donc croire que ces phénomènes de fusion de spores n'ont pas la généralité que leur attribue Hansen, à moins que, ce qui est probable, nous ayons eu affaire à une variété de cette espèce ayant perdu ce caractère (1).

Les phénomènes histologiques de cette germination ne manifestent aucun intérêt spécial. Les spores gonflées et sur le point de germer possèdent d'ordinaire une vacuole centrale remplie de corpuscules métachromatiques.

Le glycogène au contraire disparaît au moment où les spores se préparent à germer.

Le noyau se place ordinairement à l'endroit où apparaît le premier rudiment du tube germinatif et c'est à ce moment qu'il commence sa division. Cette division s'effectue par les

(1) Depuis, M. le professeur Hansen a eu l'obligeance de nous envoyer des cultures de *S. Ludwigii*, où nous avons pu constater la fusion des spores. Les cellules de ces cultures différaient par quelques détails de celles que nous avons étudiées ici, qui nous étaient parvenues de l'Institut Pasteur. et qui constituent bien une variété un peu différente de celles qu'a étudiées Hansen.

Nous nous proposons d'ailleurs de revenir sur ce sujet dans une prochaine étude.

procédés habituels, soit par un partage égal du chromoblaste, soit par étirement et étranglement médian (Pl. V, fig. de 43 à 49).

Une partie de la vacuole pénètre en même temps que le noyau dans le promycélium avec une certaine quantité de corpuscules métachromatiques. Ces derniers, comme nous l'avions déjà observé chez le *S. cerevisiæ*, ne paraissent pas être absorbés durant la germination.

CHAPITRE VI

Schizosaccharomyces

Les Schizosaccharomyces constituent un groupe spécial de levures, découvert par Lindner et vivant surtout dans les pays chauds (Afrique, Turquie, Asie mineure), se distinguant des autres levures par leur mode de multiplication qui s'effectue par un allongement et cloisonnement transversal de la cellule. Ce groupe, encore peu connu, n'est représenté jusqu'à présent que par quatre espèces :

Schiz. pombe (Lindner);
Schiz. octosporus (Beyerinck);
Schiz. asporus (1) (Eyckmann);
Schiz. mellacei (Jœrgensen).

(1) Le *Sch. asporus* ne produit jamais de spores; il ressemble beaucoup à la variété asporogène du *Sch. pombe* avec laquelle Beyerinck l'identifie. Il ne présente donc pour nous aucun intérêt, aussi le laisserons-nous de côté.

I. — Schizosaccharomyces octosporus

Le mieux connu de ces Schizaccharomyces est le *Sch. octosporus* que Beyerinck a découvert sur un grand nombre de fruits des pays chauds (raisins de Corinthe venant de la Grèce, de l'Asie Mineure et de la Turquie, figues de Smyrne). C'est une levure à cellules sphériques, qui au moment de la multiplication s'allongent et se séparent en deux cellules filles par la formation d'une cloison transversale. Souvent on observe des cellules en files très allongées, qui sont encore rattachées par leurs cloisons et qui forment des rudiments de mycélium. Les asques se produisent, suivant Beyerinck, dans des cellules allongées ; ils contiennent toujours huit spores et ce nombre fixe constituerait, d'après cet auteur, un asque typique et rattacherait définitivement les levures aux Ascomycètes.

Beyerinck est parvenu à isoler trois races de cette levure : 1° une *race asporogène* qui ne sporule jamais ; 2° une *race mixte*, dans laquelle un certain nombre de cellules sont seules capables de produire des asques et 3° une *race sporogène* dont toutes les cellules forment ordinairement des spores. Il obtient cette

dernière par une exposition prolongée des cellules de cette levure à une température de 56°. Cette température suffit pour tuer les cellules végétatives et seules les spores résistent. Ces trois races existent à l'état de mélange dans la nature.

Schiœnning retrouva ensuite le *Sch. octosporus* dans des raisins de Corinthe envoyés au laboratoire de Carlsberg et publia une note sur son mode de sporulation, dont nous parlerons dans la suite.

Nous commencerons par l'étude de cette levure : par la facilité avec laquelle elle laisse suivre le développement de ses spores dans les races sporogènes, ainsi que par la grosseur de ses cellules, elle constitue en effet un précieux objet d'étude qui nous éclairera pour l'observation des autres Schizosaccharomyces.

Beyerinck a pu constater l'existence d'un noyau visible à l'état frais, sous forme d'un granule réfringent et qui semble se diviser au moment de la formation des spores. Janssens et Leblanc l'ont étudié sommairement dans leurs recherches cytologiques sur la cellule des levures ; ils relatent simplement l'existence d'un noyau qui se diviserait par un procédé intermédiaire entre la division directe et la karyokinèse.

1° Structure

Nous avons observé dans cette levure la présence d'un noyau, d'un diamètre variant de 1 à 1,7 μ formé d'un *chromoblaste central* entouré d'un *nucléohyaloplasme incolore* (Pl. VI, fig. 1, 2, 3 et 4). Dans quelques préparations nous avons pu apercevoir des traces d'une *membrane délimitante*. Ce noyau est placé quelquefois au centre de la cellule et entouré d'un cercle de petites vacuoles, mais le plus ordinairement il se trouve à la périphérie et tout proche de la membrane. Dans ce cas encore, il est presque toujours dans le voisinage d'une grosse ou de plusieurs petites vacuoles qui contiennent quelques corpuscules métachromatiques. Mais ici ces corps ne sont jamais en très grande quantité et n'atteignent que de faibles dimensions. On sait, d'autre part, que les observations de Lindner et Beyerinck ont montré l'absence du glycogène chez les Schizoccharomyces.

La division du noyau s'effectue suivant le mode que nous avons si souvent observé : il se scinde d'abord en deux masses chromatiques, ayant quelquefois la forme de demi-disques, se regardant par leur face diamétrale, et entourées d'une même gaine de nucléoplasme; puis le nucléoplasme s'étrangle légèrement à son milieu

et donne lieu finalement à la formation d'une cloison médiane qui délimite deux noyaux distincts.

2° Sporulation

Conjugaison. — Les phénomènes qui précèdent et accompagnent la sporulation ont un intérêt tout particulier.

Schioenning a décrit chez cette levure une *formation d'asque* très curieuse, précédée de *la fusion de deux cellules :* une cellule se divise par la formation d'une cloison médiane en deux cellules filles; ces deux cellules restent quelque temps accolées l'une à l'autre sans se séparer complètement, puis se refusionnent et la cloison tranversale disparaît pour former une unique cellule qui devient la cellule mère de l'asque. Malheureusement l'auteur n'a pas observé le noyau et n'a pas pu donner d'interprétation à ce phénomène : il se demande si l'on doit le considérer comme une simple fusion de cellules telle qu'on en observe si souvent chez les champignons ou s'il présente les caractères d'un véritable acte sexuel.

Hoffmeister a constaté (1), en signalant sim-

(1) Ce travail, d'ailleurs très court, a paru à l'époque où nous avions commencé nos recherches et n'est connu de nous que depuis peu, c'est pourquoi nous n'avons pas pu l'analyser dans notre historique.

plement le fait, que les deux cellules destinées à se fusionner pour former l'asque contiennent chacune une masse homogène fortement colorée qu'il considère comme noyau et que la cellule mère de l'asque n'en renferme qu'un seul. Il y aurait donc vraisemblablement fusion des deux noyaux. Mais l'auteur n'ayant pas complété les observations de Schioenning et n'ayant pas fait d'études approfondies sur le noyau des levures, la question était donc encore loin d'être résolue.

Il nous a donc paru intéressant de reprendre cette étude. Nous avons d'abord vérifié les observations de Schioenning. Pour cela, nous avons placé quelques cellules d'une race sporogène de *Sch. octosporus* sur une cellule Van Tieghem. Nous nous servions comme milieu de culture de jus de raisin additionné de 8 p. 100 de gélatine, des expériences préalables nous ayant montré ce liquide comme très favorable au développement de cette levure et à la production des asques. Nous fixions l'objectif de notre microscope sur un point de la gouttelette pendante qui contenait quelques cellules et nous laissions ainsi le microscope pendant vingt-quatre heures, en surveillant et en dessinant toutes les demi-heures les modifications qui se produisaient. Ces expériences étaient faites l'été et la température du laboratoire

oscillant entre 25° et 30° était particulièrement favorable au développement de la levure.

En suivant à l'aide de ce procédé le développement d'un groupe de spores, on observe les phénomènes suivants : le plus souvent la membrane de l'asque se déchire avant la germination des spores et celles-ci se trouvent libres (fig. 1, A). Elles se gonflent, leurs parois s'amincissent : elles prennent l'aspect de cellules ordinaires. Généralement chacune d'elles s'allonge, devient ovale et se cloisonne à son milieu formant ainsi deux cellules qui sans se séparer immédiatement peuvent subir un certain nombre de divisions transversales (fig. 1, B). Il se forme ainsi de petits bâtonnets cloisonnés en cellules dont quelques-unes sont capables de s'élargir et de produire par une cloison longitudinale un segment latéral, qui peut à son tour s'allonger et se cloisonner transversalement sans se séparer de la cellule qui lui a donné naissance (fig. 1, II et III). On obtient alors deux bâtonnets cloisonnés qui se tiennent l'un à l'autre par une cellule. Dans d'autres cas (fig. 1, III) les cellules s'allongent peu, se coupent par une cloison transversale en deux cellules restant accolées l'une à l'autre qui fournissent chacune une nouvelle cloison perpendiculaire à la première, donnant alors quatre cellules coupées suivant leurs deux diamètres ; la division peut

se continuer, se compliquer et donner naissance à des colonies d'aspects mûriformes.

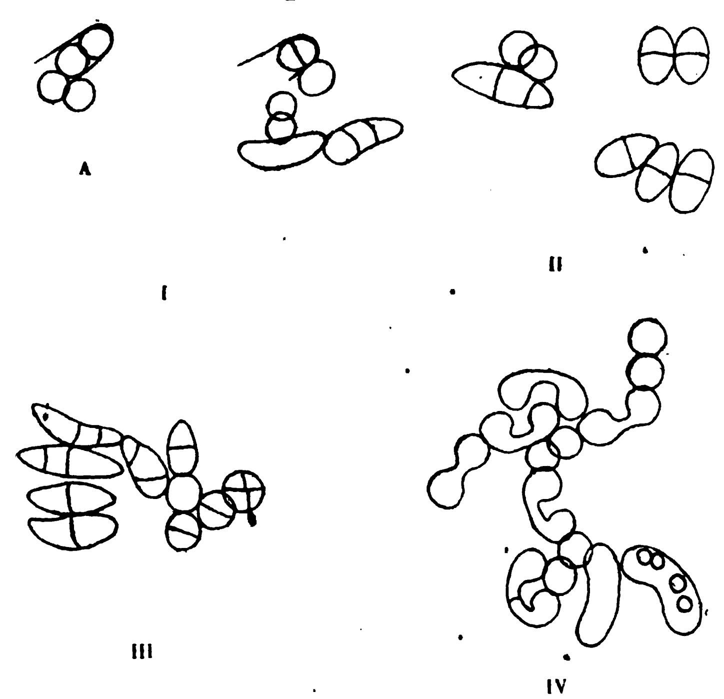


Figure 1. — Développement de cellules de race sporogène en culture sur cellule Van Tieghem. — I. Germination des spores : A, asque à quatre spores, la paroi n'est pas complètement déchirée (6 h. du soir) ; B. Cloisonnement des spores (9 h. du matin) : II et III. Multiplication des cellules. — IV. Phénomènes de conjugaison et formation des asques (Grossissement environ 700).

Chacune des spores cultivées dans ces conditions ne subit ordinairement qu'un petit nombre de divisions et vers le deuxième jour, la multiplication, sans s'arrêter complètement, se ralentit beaucoup ; c'est à ce moment que commencent les phénomènes de sporulation. Les

cellules sont arrondies, restent le plus souvent adhérentes par leurs membranes et forment une série de petites colonies séparées les unes des autres. La plupart des cellules commencent alors à se réunir deux à deux par la formation d'un canal de communication et au bout de trois où quatre jours presque toutes les cellules se sont transformées en asques (fig. 1, IV).

Sur les bords des colonies, on trouve toujours de petits groupes de deux ou trois cellules isolées, qui permettent de suivre d'une manière très précise la fusion et la formation des spores. Deux cellules restées accolées l'une à l'autre se refusionnent (fig. 2, B); cette fusion s'établit

IV

Fig. 2. — Stades successifs de la formation de l'asque (entre deux cellules sœurs).

parfois très simplement comme l'a indiqué Schioenning par la dissolution de la cloison, mais le plus souvent, elle s'effectue par un procédé un peu plus compliqué; chacune des deux cellules donne naissance à une petite protubérance à l'une de ses extrémités (fig. 2, C);

ces deux protubérances se rejoignent et se soudent l'une à l'autre, pendant que les deux cellules se séparent, formant ainsi un canal de communication qui relie les deux cellules; puis la paroi de séparation se résorbe (fig. 2, D), le canal s'élargit, la cellule unique ainsi formée par la soudure de deux individus devient peu à peu ovale (fig. 2, E) et l'on voit naître dans l'espace d'une demi-heure les spores, sous forme de petites sphères brillantes, dont on peut facilement suivre la formation (fig. 2, F). Très souvent cependant la fusion n'est pas complète et il reste dans la forme extérieure de l'asque des traces de l'individualité des deux cellules, soit qu'il y ait persistance du canal de copulation, les spores se formant aux deux extrémités renflées de la cellule, soit qu'il subsiste un léger rétrécissement médian ou une petite échancrure sur l'une des parties latérales de la cellule. Ces phénomènes s'effectuent assez rapidement et nous avons pu suivre en l'espace de vingt-quatre heures le développement complet d'un asque.

Cette fusion de deux cellules, qui correspond, comme nous le verrons, à une véritable conjugaison isogamique, paraît s'établir très souvent entre deux cellules issues d'une même bipartition : *les deux gamètes sont donc frères.* Cela s'observe très nettement lorsque l'on examine

un très petit groupe de cellules dont on a pu suivre exactement le cloisonnement ; même il peut se faire que l'une des cellules d'une colonie s'isole, se cloisonne une seule fois et que la conjugaison s'effectue entre les deux éléments ainsi formés, ce qui permet d'apporter une très grande précision dans cette étude (fig. 2).

Mais il ne faudrait pas considérer comme nécessaire que les deux gamètes soient frères. Bien souvent en effet dans une file de cellules

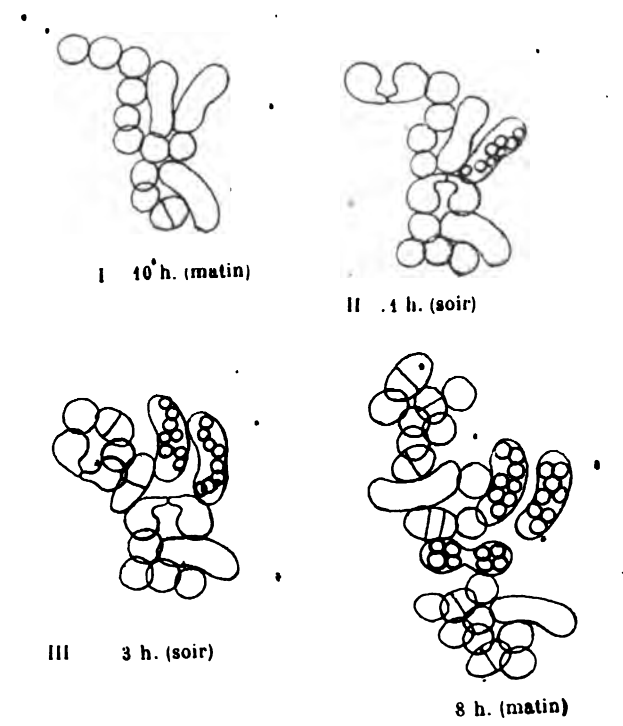
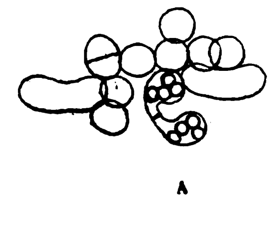
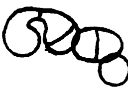


Figure 3. — Formation des asques suivie en culture sur cellule Van Tieghem. — I, II, III, IV, stades successifs de la conjugaison et de la formation des spores.

ou dans une colonie abondante, il est impossible de définir la parenté qui relie les deux gamètes (fig. 3). En outre, on est parfois certain de n'avoir pas affaire à deux gamètes provenant d'une même bipartition. C'est ainsi que l'on constate parfois une division d'un seul ou même des deux gamètes avant la résorption de la cloison séparatrice du canal de copulation ; alors les deux gamètes séparés par une génération ont perdu leur caractère de frères (fig. 4, B).



A



B

Figure 4. — A, Asques apogames. — B. Fusion se produisant entre deux cellules ne provenant pas de la même génération par suite du cloisonnement de l'une d'elles.

Enfin dans certaines cultures ayant une tendance à devenir asporogènes, on verra que les asques naissent ordinairement de la fusion de deux cellules de parenté plus ou moins éloignée.

Il peut exister un certain nombre d'anoma-

lies dans ces phénomènes de conjugaison. On observe très exceptionnellement des cellules capables de sporuler sans avoir préalablement subi cette fusion, mais il existe quelques cas plus fréquents où les deux gamètes étant sur le point de s'unir donnent lieu chacun à la formation de quatre spores sans que la paroi de séparation se résorbe (fig. 4, A). Ces phénomènes d'*apogamie* sont à rapprocher de ceux qu'on a observés chez les Mucorinées (Van Tieghem et Le Monnier, Léger) où l'un des gamètes dégénère tandis que l'autre produit un œuf parthénogénétique. De même chez le *Mesocarpus* on rencontre parfois deux cellules en voie de s'unir qui forment chacune isolément un œuf.

Dans certains cas exceptionnels, ayant observé deux cellules jointes déjà par leur canal de copulation, nous avons vu l'une d'elles émettre une nouvelle protubérance qui s'unissait avec une protubérance semblable émise par une cellule voisine. De la sorte, l'asque était le résultat de la fusion des trois cellules ; il prenait alors des formes très irrégulières. Ce phénomène, d'ailleurs très rare, se rencontre aussi à l'état d'anomalie chez certaines algues.

Nous avons constaté en outre des phénomènes très curieux que nous attribuons à la tendance que les cellules de race sporogène

placées dans de certaines conditions manifestent à se transformer en race asporogène. Nous avons en effet remarqué que presque toutes les cellules cultivées dans les milieux liquides (jus de raisin, jus de carotte) devenaient très rapidement asporogènes (1) et au bout d'une huitaine de jours après l'ensemencement sur gouttelette pendante, la culture était remplie d'un très grand nombre de cellules végétatives qui formaient de petites colonies isolées les unes des autres et ne contenant que quelques asques exceptionnels. On observait quelquefois dans ces conditions deux cellules d'une même colonie, mais isolées l'une de l'autre par quelques cellules intermédiaires, n'étant pas par conséquent de parenté immédiate, qui formaient chacune une protubérance. Les deux protubérances s'allongeaient, se rapprochaient l'une de l'autre, se rencontraient quelquefois, ou se croisaient. Dans quelques cas elles arrivaient à se fusionner et à produire un asque. Mais la plupart du temps leurs tentatives de fusion échouaient et les deux cellules et leurs protubérances aboutissaient à un cloisonnement, devenant ainsi le siège d'une abondante multiplication (fig. 5, II, III, IV et V).

(1) Beyerinck a constaté que les races sporogènes cultivées dans les laboratoires se transformaient à la longue en race asporogène.

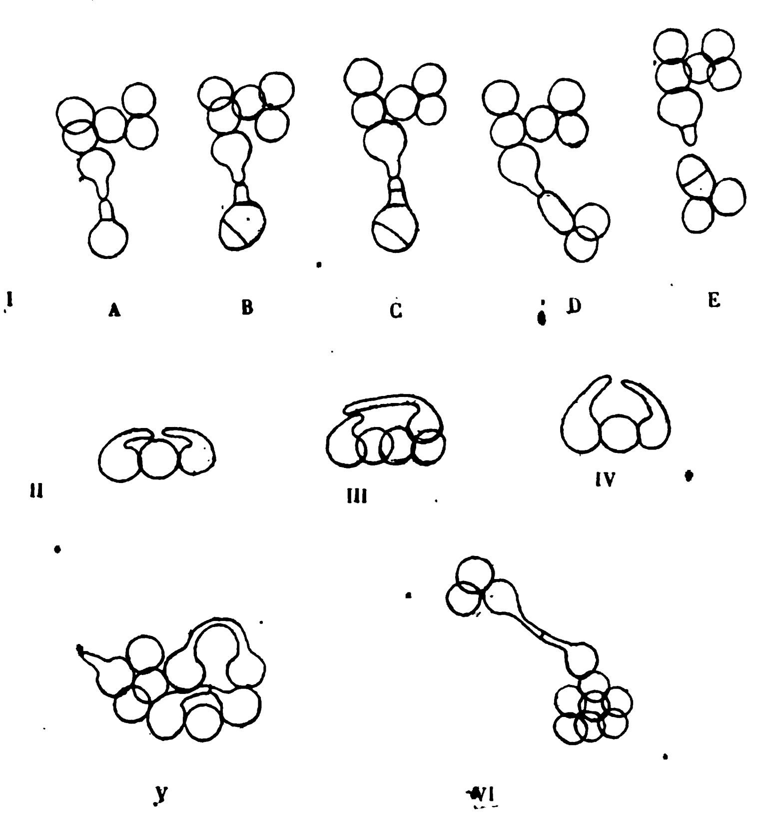


Figure 5. — Essai de conjugaison arrêté dans son développement et suivi de cloisonnement des deux cellules qui se préparaient à s'unir. — Le développement de ces cellules a été suivi heure par heure. I : A, 11 h. (matin); B, 1 h. (soir); C, 2 h. (soir); D, 6 h. (soir); E, 8 h. (matin). — II, III, IV, V : Cellules manifestant une tendance à devenir asporogènes (Essais de conjugaison entre cellules éloignées les unes des autres). — VI, Fusion s'effectuant entre deux cellules n'appartenant pas à une même colonie.

Quelquefois, on pouvait remarquer le même phénomène entre deux cellules provenant de deux colonies différentes, voisines l'une de l'autre (fig. 5, VI). Enfin dans beaucoup de

cas, certaines cellules d'une même colonie étaient capables d'émettre des protubérances qui, très éloignées les unes des autres, se dirigeaient dans un sens quelconque sans jamais se rencontrer, puis finissaient par se cloisonner, ressemblant à des tubes de germination (fig. 5, V).

Ces formations singulières, qui n'apparaissaient qu'au moment où les individus devenaient asporogènes, ne paraissent pouvoir s'expliquer que par une *perte de la faculté de sporuler* que subirait la plupart des cellules placées dans de telles conditions. Seules certaines cellules conserveraient leurs propriétés sporogènes, mais se trouvant souvent isolées les unes des autres, produiraient des protubérances, essaieraient de se rejoindre et de se souder, mais sans presque jamais y parvenir, par suite de l'éloignement qui les sépare. Il semble donc exister au moment où la race devient asporogène une série d'*essais de conjugaison* presque toujours infructueux, qui se manifestent par l'apparition de formes bizarres.

Dans les milieux insuffisants à l'alimentation du champignon, on observait également des cellules sur le point de se conjuguer, mais entravées dans leur développement; on voyait souvent deux gamètes frères réunis par leur canal de copulation, se cloisonnant chacun et

renonçant à leur fusion (fig. 5, I, A, B, C, D, E). Dans quelques cas l'un d'eux entrait en dégénérescence et l'autre s'arrondissait, prenait l'aspect d'une cellule végétative et se cloisonnait. Cela se rencontrait fréquemment dans les cultures sur gouttelettes pendantes dans les cellules retardataires qui se conjuguaient au moment où le phénomène était déjà accompli chez la plupart des autres et où les conditions du milieu devenaient défavorables.

Fusion des noyaux. — Étudions maintenant ce qui se passe à l'intérieur de la cellule. Les deux cellules destinées à s'unir pour former la cellule mère de l'asque possèdent chacune une grosse vacuole avec quelques corpuscules métachromatiques et un noyau le plus souvent placé tout près de la cloison séparatrice ou à la pointe de la petite protubérance par où va se produire la fusion. Dans le cas où il y a formation d'un canal de copulation très distinct, les deux noyaux se dirigent vers le milieu de ce tube et y subsistent pendant quelque temps séparés par la cloison. Les vacuoles restent localisées à leur place primitive et le canal de copulation est rempli d'un protoplasme très dense; il se produit là, sans doute, un mélange du protoplasme des deux gamètes après la résorption de la cloison séparatrice (Pl. VI, fig. de 4 à 11).

Au moment où la membrane disparaît, les deux noyaux se fusionnent et l'on trouve une série de stades où les deux cellules sont unies par un canal obstrué à son milieu par une cloison, les deux noyaux étant au voisinage de celle-ci, et d'autres stades dans lesquels la cloison s'est résorbée et où l'on ne remarque plus qu'un seul noyau (Pl. VI, fig. de 12 à 16). Il y existe donc *manifestement une fusion des deux noyaux;* dans quelques cas même on rencontre des cellules chez lesquelles se trouve un seul noyau placé au milieu du canal de copulation, ayant une forme allongée et paraissant indiquer une phase de fusion nucléaire (Pl. VI, fig. 17). Cependant on n'observe ordinairement aucune différence de dimension entre les noyaux primitifs et le noyau unique résultant de la fusion, soit qu'il y ait contraction de la substance nucléaire au moment de cette fusion, soit que la faible dimension du noyau ne permette pas d'apprécier de différences de volume (Pl. VI, fig. de 18 à 26). Dans les cas où il existe des traces de l'individualité des deux cellules par persistance du canal de communication, on ne peut distinguer les stades où, la cloison étant dissoute, les noyaux se préparent à se fusionner, de ceux dans lesquels s'effectue la première division de ce noyau.

Il y a presque toujours une égalité complète

entre les deux éléments qui s'unissent; cependant il arrive parfois que l'un des noyaux reste dans la cellule à sa position primitive et que le noyau de la cellule voisine soit obligé d'aller à sa recherche et l'on observe quelques cas où la fusion nucléaire ne se fait pas exactement au milieu du canal, ou même s'accomplit dans l'un des gamètes (Pl. VI, fig. 22). Il peut se faire également que les deux gamètes soient de dimensions inégales par suite d'un moindre développement de l'un d'entre eux; mais ce ne sont que des cas absolument accidentels, qui ne témoignent d'aucune différenciation sexuelle (Pl. VI, fig. 24).

Divisions nucléaires. — Le noyau provenant de la fusion des deux noyaux primitifs ne tarde pas à se diviser en deux autres qui vont à leur tour se partager et se disséminer dans les différents endroits de la cellule pour y former les spores. Cette division s'effectue exactement suivant le même mode que dans les cellules végétatives (Pl. VI, fig. de 27 à 33). Le protoplasme contient peu de produits différenciés; il est ordinairement homogène et transparent et étant donnée la grande dimension de ses cellules, cette levure est, de toutes celles que nous avons étudiées jusqu'ici, celle dont la division nucléaire et la formation des

spores nous ont paru les plus nettes et les plus faciles à étudier.

Pendant ce temps le protoplasme a subi un certain nombre de modifications. Les deux vacuoles provenant des deux gamètes restent aux deux pôles de la cellule traversée par quelques fines travées protoplasmiques, laissant entre elles une portion de protoplasme très dense qui ne tarde pas à se creuser par un certain nombre de petites vacuoles ; de la sorte le protoplasme prend l'aspect vacuolaire que nous avons trouvé chez toutes les levures au moment de la formation des spores, mais d'une façon moins nette et avec persistance de deux grosses vacuoles polaires.

Les corpuscules métachromatiques, qui sont d'ailleurs en assez petit nombre au cours de l'évolution des cellules végétatives, semblent disparaître en partie au moment de la fusion, de telle sorte qu'il n'en reste que fort peu dans l'épiplasme. Il n'existe d'autre part aucune trace de glycogène.

Formation des spores. — Les noyaux se disséminent ordinairement dans le protoplasme médian ou dans deux pôles de la cellule et c'est dans ces parties qu'apparaissent les spores. Le protoplasme s'agglomère autour des noyaux et peu à peu les spores se dessinent par un procédé

qui paraît un peu différent de celui que nous avons décrit chez les autres levures. Elles se forment beaucoup plus simplement par une condensation du protoplasme qui peu à peu se recouvre d'une membrane très mince, sans jamais présenter les formes en calotte que nous avons constatées ailleurs (Pl. VI, fig. 34 et 35).

Les spores une fois formées, cette membrane s'épaissit et sa partie externe se colore intensivement en bleu par les réactifs iodés. Beyerinck et Lindner ont déjà attiré l'attention sur ce point. Ce dernier attribue cette réaction à une imprégnation de granulose sur la membrane. Cette imprégnation est analogue à celle que l'on a souvent observée à différentes parties des asques des Ascomycètes supérieurs. Elle compense évidemment l'absence du glycogène qu'on trouve en si grande abondance dans les asques des autres levures. Son utilisation comme réserve ne fait aucun doute, car nous avons remarqué sa disparition au moment de la germination de la spore.

Les spores contiennent un noyau et un protoplasme rayonnant avec quelques corpuscules métachromatiques, comme chez les levures que nous avons précédemment étudiées (Pl. VI, fig. 36, 37 et 38).

Le nombre des spores est *typiquement de huit;* lorsque les deux cellules unies ont

conservé des traces de leur individualité, les spores se forment par groupes de quatre aux deux extrémités renflées de l'asque ; mais ce nombre de huit est loin d'atteindre la constance que lui attribue Beyerinck. Déjà Schioenning avait signalé sa variabilité ; il oscille entre un et huit ; très souvent on constate une réduction de ce nombre à quatre. Les chiffres les plus fréquents sont donc quatre et huit, ce dernier devant être considéré comme typique, et l'on observe ici, plus encore que chez le *Saccharomyces Ludwigii*, une véritable tendance à la fixité du nombre des spores : tandis que chez le *S. Ludwigii* le nombre caractéristique était de quatre, chez le *Sch. octosporus* il s'élève à huit (Pl. VI, fig. 36, 37 et 38).

Conclusions. — Il ressort donc de nos observations qu'il existe dans le *Sch. octosporus* une *véritable conjugaison* qui précède la formation de l'asque, et l'on est autorisé à considérer ce phénomène au même titre que le cas du *Mesocarpus* comme un des exemples les mieux caractérisés d'*isogamie* et à donner à la cellule mère de l'asque la valeur d'une *zygospore*. Cette isogamie nous offre ici le caractère d'une sexualité très primitive, qu'on n'a pas observée jusqu'ici : elle s'opère en effet très souvent *entre deux cellules sœurs*.

Les exemples qui nous ont été donnés chez les protozoaires nous ont plutôt habitués à rencontrer des conjugaisons entre des individus d'une parenté très éloignée. On connaît bien cependant chez les algues et chez certains champignons des exemples de conjugaison s'accomplissant entre deux cellules contiguës d'un même filament, mais dans ces cas, bien que les deux gamètes soient évidemment très proches parents, rien ne prouve qu'ils soient frères.

Toutefois un exemple plus caractéristique encore nous est offert par le *Basidiobolus ranarum*, chez lequel l'œuf peut se faire aux dépens d'une conidie à un seul noyau; celle-ci se divise par une cloison, donnant deux cellules qui se conjuguent après avoir subi une nouvelle division produisant deux petites cellules destinées à s'atrophier. La fusion s'opère donc ici incontestablement à la seconde génération. Un cas analogue nous est fourni par l'*Actinosphærium*, récemment étudié par R. Hertwig (1). Enfin il faut rapprocher ces

(1) Chez l'*Actinosphærium* (Rhizopode), la conjugaison se produit entre deux cellules provenant d'une même bipartition. Dans ces gamètes, le noyau subit deux bipartitions successives; l'un des noyaux dans la première bipartition subit une dégénérescence; le même phénomène s'opère à la seconde division; deux éléments nucléaires disparaissent

phénomènes de sexualité des conjugaisons nucléaires qui, suivant Dangeard, précéderaient toujours la formation de l'asque des Ascomycètes supérieurs. Ici encore les noyaux destinés à se fusionner sont très proches parents, mais ne paraissent provenir toutefois que d'une deuxième génération. Mais jamais on n'avait encore constaté d'une manière évidente des exemples de conjugaison s'opérant directement entre deux cellules sœurs.

Enfin ces phénomènes de sexualité nous offrent un intérêt spécial, car c'est la première fois qu'on les constate chez les levures. A peu près en même temps que nous, Barker observait des phénomènes d'isogamie précédant la formation de l'asque dans une levure à multiplication bourgeonnante, découverte par lui dans la fermentation du gingembre commercial, dont il a fait le genre *Zygosaccharomyces*.

Les descriptions de Barker ressemblent d'une manière surprenante à celles que nous venons de faire du *Sch. octosporus;* les phénomènes s'accomplissent aussi par la soudure de deux petites proéminences formant un canal

ainsi dans chaque gamète ; Hertwig les assimile à des globules polaires. Finalement, les gamètes uninucléés opèrent leur conjugaison et fusionnent leurs noyaux pour donner naissance à l'œuf. Les deux noyaux qui se fusionnent sont donc séparés par deux générations.

de copulation et l'asque conserve des traces d'individualité des deux cellules primitives. Mais l'auteur, ne possédant pas de données suffisamment précises sur le noyau des levures, n'a pas osé se prononcer définitivement sur la fusion nucléaire (1), bien qu'il attribue à ce phénomène une valeur sexuelle.

Nos observations jointes à celles de Barker nous montrent donc que les levures, à l'exemple de beaucoup de microorganismes, sont susceptibles de se reproduire sexuellement et cette notion présente une grande importance au moment où la question de la reproduction sexuelle des Ascomycètes est encore très embrouillée.

II. — Schizosaccharomyces pombe (Lindner).

Le *Schizosaccharomyces pombe* est le plus anciennement connu des Schizosaccharomyces. Il fut trouvé en 1890 dans les produits de fermentation du millet et fut étudié par Lindner. Il

(1) Barker observe dans chaque cellule un granule fortement coloré qu'il hésite à considérer comme noyau. Au moment de la fusion des deux cellules, il constate une fusion de ces deux granules qui pourrait être considérée comme une fusion nucléaire.

est beaucoup plus petit que la levure précédente ; ses cellules sont allongées et offrent l'aspect de petits bâtonnets, ressemblant aux conidies de l'*O. lactis* et qui se divisent par la formation de cloisons transversales. Parfois il se produit de longues chaînes de cellules qui restent un certain temps rattachées les unes aux autres, ce qui augmente encore l'analogie existant entre cette levure et l'*O. lactis*. Elle s'en distingue cependant par la plus petite dimension de ses cellules. Il peut également se faire des diverticules latéraux donnant de nouvelles files de cellules perpendiculaires aux premières. Dans les vieilles cultures, les cellules s'arrondissent et prennent l'aspect des levures ordinaires.

Les spores naissent assez facilement sur tous les milieux, même dans les liquides de fermentation, mais il n'y a que très peu de cellules qui soient capables de sporuler.

Beyerinck, qui a repris ensuite l'étude de ce Schizosaccharomyces, montra qu'il pouvait de même que le *Schizosaccharomyces octosporus* donner lieu à des *races asporogènes* et à des *races sporogènes* dans lesquelles il se produisait une assez abondante sporulation, mais il n'y a point de distinctions aussi tranchées entre les deux races que pour le *Schizosaccharomyces octosporus*.

Structure. — Le *Schizosaccharomyces pombe* n'a jamais été étudié au point de vue de sa structure. Janssens et Leblanc le citent parmi les levures qu'ils ont observées, mais ne donnent aucun détail.

A l'aide de l'hémalun et de l'hématoxyline au fer, nous avons facilement réussi à mettre en évidence le noyau. Ce noyau est assez petit (environ 0,55 μ de diamètre) et se présente avec le même aspect que celui que nous avons trouvé chez le *Schizosaccharomyces octosporus* (Pl. VII, fig. de 1 à 4). Il est constitué d'un *chromoblaste* entouré d'une zone de *nucléoplasme incolore*, dont on ne distingue ordinairement pas la membrane.

Les cellules jeunes ont une forme rectangulaire ou ovale, légèrement plus longue que large ; le noyau occupe la périphérie de la cellule ou l'un de ses pôles. Le centre de la cellule contient un certain nombre de vacuoles très petites, très rapprochées l'une de l'autre et remplies de corpuscules métachromatiques (Pl. VII, fig. de 5 à 8). Souvent ces vacuoles se fusionnent en une seule vacuole. Au moment où la cellule est sur le point de se diviser, on remarque une répartition des vacuoles en deux groupes disposés aux deux pôles de la cellule. Le protoplasme forme alors entre les deux groupes de vacuoles une masse

homogène, qui contient le noyau et par où la cellule se divisera.

Le noyau se divise par le même procédé que chez le *Schizosaccharomyces octosporus* et, cette division opérée, on ne tarde pas à voir apparaître au centre de la cellule une cloison d'abord très mince qui s'épaissit peu à peu et sépare les deux cellules filles.

Pas plus que chez le *Schizosaccharomyces octosporus*, on ne remarque de glycogène dans l'intérieur des cellules.

Conjugaison et Sporulation. — Les asques se forment par petites colonies dans les cultures sur carotte. Sur ce milieu nous avons trouvé facilement une grande abondance d'asques et par des ensemencements successifs de leurs spores sur le même milieu, nous avons réussi à isoler des races sporogènes, qui, bien que toujours mêlées à un grand nombre de cellules asporogènes, présentaient néanmoins assez de commodité pour l'étude du développement de l'asque.

Nous avons donc suivi la formation de cellules provenant des cultures ainsi obtenues, sur gouttelette pendante en employant le même procédé que dans le cas précédent (jus de raisin gélatinisé) et nous avons pu observer le développement d'un groupe de cellules. On

voyait très vite les cellules s'allonger, se cloisonner, former de longs bâtonnets capables quelquefois de se ramifier latéralement; chacune des cloisons s'arrondissait et les cellules glissaient l'une sur l'autre, se disposaient en files plus ou moins tortueuses mais restaient presque toujours légèrerement adhérentes par un côté de la membrane. C'est alors qu'on voyait apparaître vers le deuxième ou troisième jour le début des phénomènes de la sporulation.

Pour la première fois, dans cette levure, nous observons une *conjugaison* précédant la sporulation ; ce phénomène y présente les mêmes caractères que dans le *Schizosaccharomyces octosporus* et nous avons pu nous assurer que l'asque provenait bien encore ici d'une *isogamie*. Deux cellules contiguës d'une même file (fig. 6; I), souvent sœurs et adhérant légèrement l'une à l'autre, émettent chacune une petite protubérance ; les protubérances se soudent, formant un canal de copulation (fig. 6, II) dont la membrane de séparation finit par se résorber (fig. 6, III); les deux gamètes sont ainsi réunis en une seule cellule qui devient la cellule mère de l'asque. Mais ici les deux gamètes, une fois joints l'un à l'autre, conservent toujours des traces de leur individualité et de leur position respective d'une manière plus

marquée encore que dans le *Schizosaccharomyces octosporus ;* cela donne lieu à des figures étranges composées de deux renflements

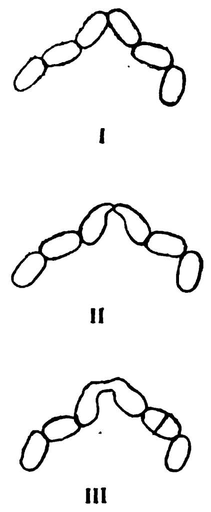


Figure 6. — Stades de conjugaison suivis en cellule Van Tieghem : I, 9 heures (matin). II, 1 h. (soir). III, 3 h. (soir).

parfois situés suivant des axes différents, quelquefois même perpendiculaires l'un à l'autre et unis par un canal étranglé (fig. 7, 3, 7, 8, 9, 11).

Les spores naissent le plus souvent aux deux extrémités renflées ; elles sont ordinairement au nombre de *quatre*, deux à chacun des pôles, et il existe encore ici la tendance à la fixité du nombre des spores que nous avions précédemment remarquée. Mais ce nombre est également sujet à un certain nombre de variations et l'on voit quelques cas où les spores sont réduites à

deux, parfois même il peut n'en exister qu'une seule.

Cette conjugaison que nous venons de décrire

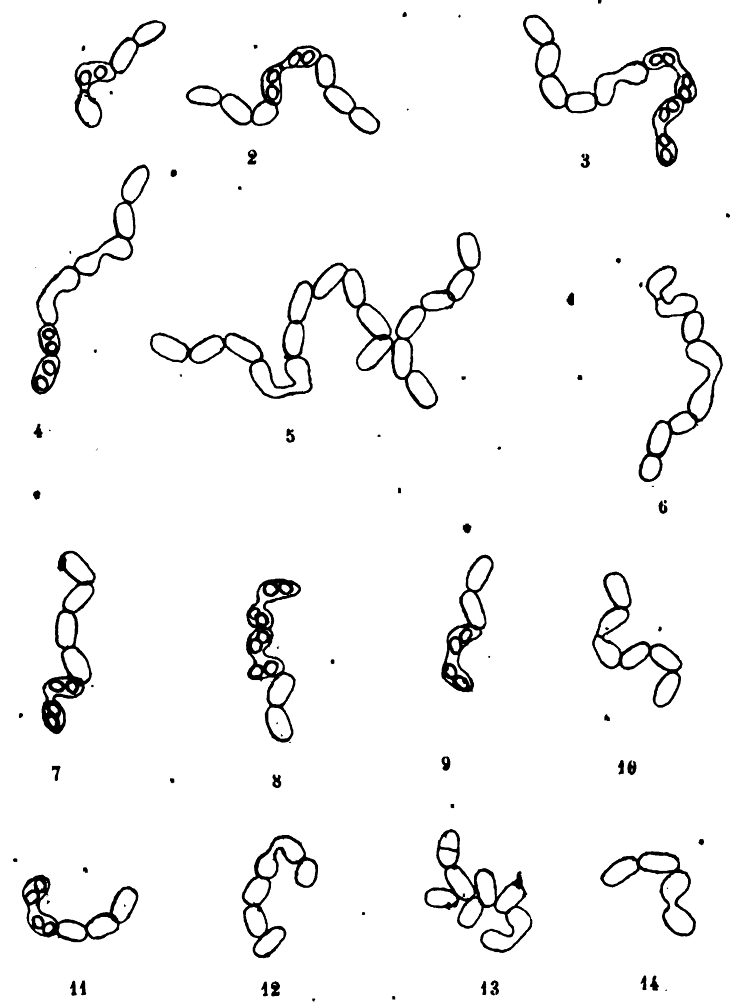


Figure 7. — Colonies sporogènes examinées en culture sur cellule Van Tieghem et montrant les divers stades de la conjugaison et de la formation des asques.

et qui n'avait jamais encore été signalée, explique les dessins figurés par Lindner où les asques présentent la forme d'un hachoir, dont les deux manches sont occupés par les spores.

On observe quelques cas d'apogamie. Un certain nombre de cellules peuvent se développer directement en asques (fig. 7, 4) et ce cas est beaucoup plus fréquent que chez le *Sch. octosporus*. Souvent aussi deux gamètes réunis l'un à l'autre, mais dont la cloison subsiste encore, forment chacun un asque à deux spores sans se fusionner (fig. 7, 2). D'autres fois l'un d'eux dégénère et l'autre donne naissance soit à deux, soit à quatre spores (fig. 7,1).

Fusion des noyaux. — Les phénomènes histologiques qui accompagnent la sporulation diffèrent fort peu de ceux que nous avons observés chez le *Sch. octosporus*. Les deux gamètes possèdent chacun une grosse vacuole ou un certain nombre de petites vacuoles. Au moment où ils se fusionnent (Pl. VII, fig. de 9 à 12), le protoplasme s'accumule dans le canal de copulation et y offre un aspect très dense, puis se creuse à son tour de quelques vacuoles; mais ici les vacuoles contiennent une grande quantité de corpuscules métachromatiques qui persistent dans l'épiplasme.

Les deux noyaux occupent le milieu du canal

de communication et c'est à cet endroit qu'ils *se fusionnent* (Pl. VII, fig. de 13 à 20); cette fusion opérée, ils subissent leur première division et émigrent dans les deux renflements où ils se divisent en deux de façon à former deux spores dans chacun des deux renflements. (Pl. VII, fig. de 21 à 24). Cette division s'effectue comme dans les cellules végétatives.

L'épiplasme ne contient pas de glycogène, mais les spores sont imprégnées de granulose. Les corpuscules métachromatiques qui n'avaient subi aucune modification avant la formation des spores présentent à ce moment des *phénomènes de dissolution* (Pl. VII, fig. de 26 à 28), l'épiplasme est peu à peu absorbé, les spores grossissent et finissent par occuper toute la cellule. L'asque se déchire ordinairement avant la germination et cette déchirure se produit presque toujours suivant le milieu du canal de copulation dont le contenu s'est vidé et qui présente une moindre résistance que les autres parties de l'asque.

Il existe donc ici encore un véritable phénomène de *conjugaison par isogamie* présentant des caractères très voisins de ceux que nous avons observés chez le *Sch. octosporus*, avec cependant des cas plus fréquents d'apogamie.

III. — Schizosaccharomyces mellacei (Jœrgensen)

Greg a isolé cette levure qui se présente au cours de la fabrication du rhum effectuée avec la mélasse de sucre de canne à la Jamaïque. Elle a été désignée par Jœrgensen et Holm sous le nom de *Sch. mellacei*. Il paraît exister plusieurs types de la même espèce.

Le *Sch. mellacei* est encore fort peu connu; ses caractères le rapprochent beaucoup du *Sch. pombe* et Beyerinck le considère comme une variété de cette espèce.

Nous avons pu examiner deux types de ce Schizosaccharomyces qui nous avaient été envoyés grâce à la complaisance de M. le professeur Beyerinck. Ces deux types différaient peu l'un de l'autre; l'un présentait des *phénomènes isogamiques*, l'autre sporulait difficilement et ne paraissait produire que des *asques apogames*.

Nous n'étudierons donc ici que la première de ces variétés. Cette levure montre des formes presque identiques à celles du *Sch. pombe* et ne s'en distingue guère que par ses dimensions légèrement supérieures; elle a un noyau analogue.

Conjugaison et sporulation. — La formation des asques s'observe facilement sur gouttelettes pendantes. Il paraît exister également des colonies asporogènes et des colonies sporogènes. Les colonies sporogènes sont ici beaucoup plus nombreuses que dans le *Sch. pombe* et la formation des asques est plus facile à suivre.

Les asques se forment d'une manière absolument semblable à celle que nous avons observée chez le *Sch. pombe*. Deux cellules contiguës d'un même filament et provenant ordinairement de la même bipartition, encore accolées l'une à l'autre, se conjuguent (fig. 8);

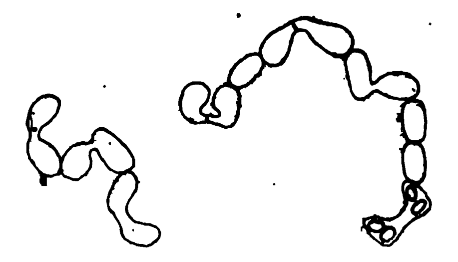


Figure 8. — Différents stades de la conjugaison et de la formation de l'asque.

la cellule provenant de cette fusion conserve toujours deux renflements indiquant le contour primitif des deux gamètes. Les spores sont ordinairement au nombre de quatre, disposées par deux dans chacun des renflements. Enfin on rencontre également des cas

assez fréquents d'apogamie. Il n'y a donc aucune différence entre l'asque du *Sch. pombe* et celui du *Sch. mellacei;* il semble donc que conformément à l'opinion de Beyerinck, il n'y ait pas lieu de séparer ces deux espèces.

Jœrgensen avait décrit des asques en forme de hachoir; il avait aussi mentionné dans les vieilles cultures des cellules unies entre elles par un petit canal, mais sans en comprendre le sens et sans remarquer la relation qui existait entre ces cellules et les asques.

Les phénomènes histologiques s'opèrent exactement de la même façon que dans le *Sch. pombe* et l'on remarque une *fusion nucléaire* accompagnant toujours la fusion des deux gamètes et se produisant vers le milieu du canal de copulation (Pl. VII, fig. de 29 à 35).

Ces *phénomènes d'isogamie* que nous avons rencontrés chez les trois seuls représentants sporogènes jusqu'alors connus des Schizosaccharomyces doivent donc être considérés comme un des caractères importants de ce groupe, caractère qui le distingue de tous les autres groupes de levures et qui lui donne, avec le *Zygosaccharomyces* un intérêt histologique et phylogénétique tout à fait spécial.

CHAPITRE VII

S. mycoderma cerevisiæ. — S. mycoderma vini. — S. apiculatus. — S. kefir. — Endomyces albicans. — Monilia candida. — Ustilago avenæ. — Ustilago maydis.

Nous étudions dans ce chapitre la structure d'un certain nombre de champignons à formes levures, dont quelques-uns occupent une place indéterminée dans la classification ; les uns se rattachent à la catégorie des *Non-Saccharomyces* de Hansen, les autres appartiennent au contraire à des champignons d'ordre plus élevé, dont nous étudierons les formes levures comparativement aux Saccharomyces.

I. — Saccharomyces mycoderma cerevisiæ (Hansen). — Saccharomyces mycoderma vini (Winogradsky).

Ces deux levures rencontrées, l'une par Hansen dans les brasseries de Copenhague, l'autre

par Winogradsky sur le vin, diffèrent peu l'une de l'autre. Leurs formes sont assez variables et généralement plus ou moins allongées.

Dans son plus jeune âge, le *S. mycoderma cerevisiæ* (Pl. VII, fig. de 36 à 49) présente un protoplasme homogène dans lequel on observe une ou plus ordinairement deux vacuoles placées aux deux extrémités de la cellule et contenant un nombre variable de corpuscules métachromatiques. Le noyau (d'environ 1 μ de diamètre) s'aperçoit avec beaucoup de netteté formé d'un *chromoblaste*, d'un *nucléohyaloplasme incolore* et *d'une membrane limitante*. Il est souvent placé au centre de la cellule, entre les deux vacuoles.

Sa division s'effectue par un partage transversal de la masse chromatique en deux chromoblastes suivant le cas ordinaire.

La structure du *S. mycoderma vini* (Pl. VII, fig. de 50 à 54) diffère peu de celle de la précédente levure. On remarque également dans les jeunes cellules une ou plus fréquemment deux vacuoles à corpuscules métachromatiques. Le noyau possède une structure analogue au nucléoplasme et chromoblaste. Sa division s'accomplit suivant le même procédé.

Dans ces deux levures, le glycogène, d'ailleurs peu abondant, paraît uniquement localisé dans le protoplasme.

II. — Saccharomyces apiculatus (Rees-Hansen)

Rees a donné ce nom à une levure de forme particulière, caractérisée par la présence à une ou deux des extrémités de l'ovale de la cellule d'un petit mamelon plus ou moins long, en pointe de citron. Hansen, qui a consacré une longue étude à cette levure très abondante dans la nature, s'est assuré qu'elle ne donnait jamais de spores.

Cette levure, très petite, offre une très grande difficulté pour l'étude de sa structure. Elle présente dans ses jeunes cellules un protoplasme homogène, dans lequel on distingue une vacuole renfermant un certain nombre de corpuscules métachromatiques et *un noyau très petit* et ordinairement accolé à la vacuole. Ce noyau se montre sous forme d'une masse arrondie et homogène. (Pl. VII, fig. de 55 à 62).

Sa division est difficile à observer, cependant elle paraît se faire suivant le procédé habituel d'allongement et de constriction.

Dans les cellules allongées, il peut se former une vacuole à chacune des deux extrémités de la cellule.

III. — Saccharomyces kefir (Beyerinck)

Beyerinck a isolé ce Saccharomyces de la fermentation du kéfir. C'est une levure de forme plus ou moins sphérique, ressemblant un peu au *S. cerevisiæ* avec lequel on l'avait confondue, et qui s'allonge en vieillissant. Elle ne possède pas d'asques.

Elle offre au début de son développement une ou plusieurs vacuoles contenant un nombre variable de corpuscules métachromatiques. Le noyau est presque toujours en proximité avec ces vacuoles ; il atteint ordinairement 1 μ de diamètre et se montre, dans les cas les plus favorables, constitué d'un *chromoblaste* et d'un *nucléohyaloplasme* limité par une *membrane*.

Sa division se produit le plus souvent par étirement et étranglement, quelquefois aussi par un partage du chromoblaste en deux portions égales (Pl. XI, fig. de 7 à 11).

Au cours du développement, les cellules sont susceptibles de s'allonger. Les vacuoles se divisent et envahissent tout le protoplasme qui alors prend une structure alvéolaire, chacune des vacuoles contenant une certaine quantité de corpuscules métachromatiques.

Le glycogène peu abondant imprègne le protoplasme, mais ne paraît pas se localiser dans les vacuoles.

IV. — Endomyces Albicans (Vuillemin)

Ce champignon, qui est l'agent provocateur d'une maladie bien connue, le *Muguet*, est un de ceux qui ont eu le privilège d'être le plus étudiés. D'abord rapproché des Oïdium par Robin qui lui donna le nom d'*Oïdium albicans* qui a prévalu, il fut considéré par Quinquaud comme un genre à part qu'il appela *Syringospora Robinii*. Grawitz l'identifia ensuite avec le *S. Mycoderma vini*. Ress le classe parmi les Saccharomyces sous le nom de *S. albicans*, nom accepté par Van Tieghem. En 1885 Plaut l'assimile au *Monilia candida* de Bonorden. En 1890 Roux et Linossier en font un champignon spécial caractérisé par la présence de kystes (Chlamydospores) qu'ils considèrent comme des formes durables de l'*Oïdium albicans*. A peu près à la même époque Laurent le rapproche des Dématiées et propose le nom de *Dematium albicans*. Plus tard Heim le classe parmi les Entomophthorés dans le genre *Empusa*. En 1896 Vuillemin découvre des asques dans l'*Oïdium albicans*. Ces asques se forment très facilement dans les

conditions défavorables et particulièrement dans les vieilles cultures sur betterave. Ils débutent par la formation de kystes (chlamydospores de Roux et Linossier) qui sont capables soit de germer eux-mêmes lorsque les conditions sont favorables, soit de se transformer en asques et de produire à leur intérieur quatre spores ovales. Vuillemin se croit donc autorisé à classer ce champignon dans le genre Endomyces et le désigne sous le nom d'*Endomyces albicans* qu'il rapproche de l'*Endomyces decipiens.*

Ce champignon présente, quoi qu'on en ait dit, de grands rapports morphologiques avec les levures. Tantôt il se compose presque exclusivement de cellules levures, tantôt il est capable de donner des formes allongées ressemblant aux voiles des levures et même de produire des filaments composés d'articles assez allongés et qui lui donnent l'aspect d'un Dematium.

Sans insister sur ces détails morphologiques qui sont ici hors de notre sujet, nous nous bornerons à constater la présence de deux formes très distinctes offertes par ce champignon, l'une sur le liquide Raulin, l'autre sur tranches de carotte.

Dans le liquide Raulin l'*E. albicans* ne donne pendant longtemps que des formes levures, très différentes de celles qu'il est susceptible de

produire dans les autres milieux. Elles ont l'aspect de grosses cellules, presque entièrement sphériques et ressemblant au *S. cerevisiæ*. A la fin du développement, elles manifestent une tendance à s'allonger et à devenir filamenteuses.

Une forme très différente est obtenue sur tranches de carotte. Le développement débute par des formes levures beaucoup plus petites que les précédentes, parfois sphériques, souvent allongées. Au bout d'un certain temps on remarque la formation de cellules mycéliennes ressemblant tantôt à un voile de levure, tantôt à un Dematium.

Dans le liquide Raulin, on observe un développement très semblable à celui que nous avons suivi dans le *S. cerevisiæ*. On remarque dans les premiers stades la formation d'une ou plusieurs petites vacuoles à corpuscules métachromatiques, au milieu d'un protoplasme très dense. Le noyau est situé au voisinage de ces vacuoles. Il est sphérique, et possède un diamètre élevé pouvant atteindre jusqu'à près de 2 μ. Ce noyau se différencie très facilement et avec la plupart des colorants (fuchsine, violet de gentiane, hémalun, bleu de méthylène, vert de méthyle.) L'iodo-iodure de potassium le met en évidence, et même un examen attentif des cellules à l'état frais le laisse quelquefois dis-

tinguer. Une préparation bien colorée, soit à l'aide de l'hémalun, soit avec le bleu de méthylène, le montre constitué d'un *chromoblaste* entouré d'un *nucléohyaloplasme* incolore et d'*une membrane*. Cependant il offre le plus souvent l'aspect d'une masse homogène, surtout dans les préparations obtenues avec le procédé de Heidenhain.

Dans les stades ultérieurs, on voit apparaître des vacuoles à glycogène qui envahissent les cellules comme dans le *S. cerevisiæ*. Les vacuoles primitives sont refoulées à la périphérie et finalement les cellules se montrent formées d'une énorme vacuole limitée par une mince couche pariétale de protoplasme renfermant un certain nombre de corpuscules métachromatiques et un noyau accolé à la membrane (Pl. VIII, fig. 9, 10 et 11). Le contenu de la vacuole se présente coloré sous forme de granules analogues à ceux sur lesquels nous avons déjà attiré l'attention.

La division du noyau s'effectue soit par allongement et étirement, soit par partage égal du chromoblaste en deux petites masses nucléaires.

Les cellules provenant des cultures sur carotte ont une structure peu différente. Tantôt les cellules sont sphériques et contiennent une vacuole à corpuscules métachromatiques et un noyau accolé à cette vacuole, tantôt elles sont

plus ou moins allongées et il existe un certain nombre de vacuoles se succédant dans la longueur de la cellule. Dans la suite, il se forme des vacuoles glycogéniques à des endroits variables.

Le noyau montre quelquefois un chromoblaste et un nucléohyaloplasme, mais souvent il paraît homogène. Sa division se produit tantôt par étirement, tantôt par scission transversale du chromoblaste (Pl. VIII, fig. de 1 à 7). Ce dernier mode est le plus fréquent. Quelquefois même il arrive que cette division précède l'apparition du bourgeon et peut sans doute expliquer que Vuillemin ait décrit chez ce champignon un noyau formé ordinairement de deux nucléoles et que nous n'avons jamais observé.

Dans les formes allongées on ne trouve d'ordinaire qu'un seul noyau par cellule, cependant on peut en rencontrer plusieurs.

Nous avons tenté toujours en vain d'obtenir des spores et par tous les moyens possibles. Depuis trois ans que nous cultivons l'*Endomyces albicans* sur les milieux les plus variés, nous n'avons jamais eu la chance d'obtenir ni les kystes de Roux et Linossier, ni les asques de Vuillemin. Nous avons cependant essayé tous les procédés employés par ces auteurs (liquide Nœgeli, cultures sur betterave), et nous avons

eu sous la main des cultures d'origine différente, dont trois provenaient de malades de l'hôpital et dont l'autre nous avait été envoyée de l'Institut Pasteur.

Il eût été intéressant de pouvoir comparer le développement cytologique de ces asques avec celui des Saccharomyces.

V. — Monilia candida (Hansen)

Le *Monilia candida* fut rencontré par Hansen dans la bouse de vache et sur certains fruits sucrés. C'est une levure ressemblant beaucoup à l'*E. albicans*. Elle donne d'abord dans les solutions sucrées une vigoureuse végétation de cellules se rapprochant des Saccharomyces et, au bout de quelques jours, produit à la surface du liquide un voile présentant l'aspect un peu duveté d'une moisissure.

Ce voile est composé de cellules qui deviennent plus allongées au fur et à mesure que la culture vieillit et qui se ramifient et rappellent un peu les Oïdium et les Dematium. Hansen a assimilé ce champignon au *Monilia candida* de Bonorden.

Les cellules contiennent une ou plusieurs vacuoles renfermant un nombre variable de

corpuscules métachromatiques. Le noyau est généralement très proche de ces vacuoles. Il possède un diamètre se rapprochant de 1 μ; il se montre sous forme d'un *chromoblaste* entouré d'un *nucléoplasme incolore*. On aperçoit quelquefois une *membrane* délimitant ce nucléoplasme. La division s'accomplit le plus fréquemment par une coupure transversale du chromoblaste en deux parties égales (Pl. VIII, fig. de 27 à 36).

Le glycogène se localise dans des vacuoles qui se disposent à un endroit quelconque de la cellule, si celle-ci est allongée, ou qui occupe le milieu de la cellule, refoulant et détruisant les vacuoles à corpuscules métachromatiques, si la cellule est sphérique.

Sur carotte, le développement s'effectue très rapidement et au bout de trois jours, le substratum est entièrement envahi. On observe alors la formation de globules d'huile qui naissent dans le protoplasme; ces globules, qui apparaissent de très bonne heure sur la carotte, ne se forment que beaucoup plus tardivement dans le liquide Raulin et dans certains autres milieux. Ils ne paraissent pas servir à la nutrition du *M. candida* et il y a toute raison de croire qu'ils sont dus, comme chez les autres champignons que nous avons observés jusqu'ici, à un commencement de dégénérescence du pro-

toplasme (1). Vers la fin du développement les cellules sont, en effet, constituées d'une très petite quantité de protoplasme et d'énormes globules d'huile occupant une grande partie de leur volume. Il existe encore du glycogène en plus ou moins grande quantité, mais les corpuscules métachromatiques ont diminué préalablement dans les vacuoles qui les renfermaient, en subissant une *dissolution* analogue à celle que nous avons constatée au moment de la sporulation des levures.

Les formes mycéliennes peuvent posséder plusieurs noyaux par article, mais n'en contiennent typiquement qu'un seul.

VI. — Torula nigra (Marpmann)

Ce champignon, découvert par Marpmann et désigné par lui sous le nom de *Saccharomyces niger*, a été plus tard étudié par Lindner et Hansen, qui lui ont donné la désignation plus appropriée de *Torula nigra* et l'ont considéré

(1) Nous avions observé aussi chez l'*Oïdium lactis* et notamment en culture sur carotte où le développement s'effectue d'une manière très rapide une dégénérescence précoce du protoplasme manifestée par l'apparition de globules d'huile.

comme appartenant probablement au genre Cladosporium ou au genre Fumago.

Le *Torula nigra* végète abondamment sur carotte et c'est dans ce milieu que nous l'avons étudié. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, la carotte est envahie par une masse gluante d'un vert noirâtre, qui est composée exclusivement de formes levures ovales ou légèrement allongées. Quelques jours après, on voit naître dans les parties les moins humides de la carotte un mycélium très grêle, qui surgit de la masse noire des levures et se détache en un feutrage gris.

Les formes levures, examinées dans les premiers stades de leur développement, présentent ordinairement deux petits corpuscules métachromatiques entourés chacun d'une zone claire, et placés aux deux pôles de la cellule. Les deux zones claires entourant ces corpuscules sont chacune l'origine d'une vacuole.

Le noyau se trouve vers le centre (Pl. VIII, fig. de 12 à 26). Il ne se distingue que comme une masse homogène se différenciant en bleu par l'hémalun et limitée parfois par une zone hyaline de nucléoplasme.

Sa division s'effectue par scission transversale du chromoblaste.

Ces levures sont agglomérées dans un mucus qui prend une coloration rougeâtre avec

l'hémalun et contient quelques particules solides noirâtres, auxquelles est due sans doute la couleur noire de la culture.

Au fur et à mesure que le développement s'avance, les deux vacuoles grossissent et finissent par occuper la majeure partie de la cellule, séparées seulement par une mince bande protoplasmique contenant le noyau. Pendant ce temps, les corpuscules métachromatiques se développent et remplissent les vacuoles de granules de formes variées.

Il ne paraît pas exister de vacuoles glycogéniques.

On observe dans les cultures âgées des formes levures qui s'allongent, se multiplient sans se séparer complètement, formant ainsi des articles capables d'émettre des bourgeons latéraux, et qui ressemblent aux voiles des levures et particulièrement aux formes mycéliennes de l'*E. albicans* et du *M. candida*. Ces articles possèdent une structure analogue à celle des formes levures et il n'existe le plus souvent qu'un seul noyau par cellule. Mais à côté de cela, se trouve un véritable mycélium analogue à celui des Dematium, à articles très longs avec des bourgeonnements latéraux et des ramifications (Pl. VIII, fig. 22). Dans ce cas, il existe un grand nombre de vacuoles se succédant à intervalles plus ou moins réguliers dans l'intérieur

des articles et qui à un stade ultérieur se réunissent et subissent une évolution analogue à celle que nous avons décrite pour le *D. species* et l'*O. lactis*. Chaque article possède généralement plusieurs noyaux.

Ce champignon se rattache donc très probablement aux Dématiées.

VII. — Ustilago maydis (Corda). — Ustilago avenæ (Rostrup)

Nous avons tenu à compléter ces recherches par une étude des formes levures des Ustilaginées qui, par leur aspect, présentent de même que les Dématiées une étroite relation avec les véritables levures.

Cette étude fut déjà entreprise par un certain nombre d'auteurs.

Mœller constate dans les conidies levures des Ustilaginées une structure très voisine de celle qu'il avait étudiée chez les levures, avec un seul noyau par cellule. Dangeard arrive aux mêmes résultats.

Au contraire von Istwanfi observe dans les formes levures d'un certain nombre d'Ustilaginées la présence de trois noyaux, l'un au centre de la cellule, les deux autres occupant

les deux pôles..Dans certaines de ces formes de levures (*Ustilago anthrarum*), la multiplication du noyau précède le bourgeonnement et l'on peut trouver, d'après lui, un grand nombre de noyaux par cellule. Il remarque en outre qu'il existe toujours un rapport entre la position des noyaux et la naissance des bourgeons.

On doit à Maire une étude très complète sur les conidies levures de l'*Ustilago maydis*. Cet observateur constate comme Mœller et Dangeard une grande analogie de structure entre les conidies levures de l'*Ustilago maydis* et les Saccharomyces.

Il différencie un noyau, qui dans les meilleures préparations se montre constitué d'un nucléohyaloplasme incolore, limité par une membrane, et dans lequel se trouve un karyosome fortement coloré. Dans les premiers stades du développement, il observe aux deux pôles de chaque cellule un corps sphérique, d'aspect réfringent, que Dangeard avait pris pour un globule oléagineux. Ces globules ne possèdent pas, d'après lui, les propriétés des corps gras ; ils se colorent en rouge vineux par l'hématoxyline et le bleu de méthylène et sont entourés d'une zone hyaloplasmique incolore. Maire les assimile à juste titre avec les corpuscules métachromatiques de Babès. Les noyaux placés au milieu de la cellule se distinguent de

ces granules par la coloration bleue qu'ils prennent avec l'hémalun.

Plus tard, Maire figure des vacuoles occupant une grande partie de la cellule ; les corpuscules métachromatiques se placent alors tout autour de ces vacuoles, après avoir augmenté considérablement de nombre.

Il considère ces granulations métachromatiques comme des grains de sécrétion, formés de produits de rebut qui encombrent de plus en plus la cellule dont la vitalité se ralentit.

La division de ce noyau s'effectuerait par les deux procédés que nous avons rencontrés, l'un serait une division directe (allongement et étirement des noyaux), l'autre (scission du chromoblaste) appartiendrait à un mode intermédiaire entre la division directe et la karyokinèse.

Nous avons étudié l'*Ustilago maydis* et l'*Ustilago avenæ*.

Les conidies levures de l'*Ustilago maydis* ressemblent à de petites levures : elles sont allongées, pointues à leurs deux extrémités. Au commencement de leur développement, elles montrent un protoplasme homogène dans lequel on distingue deux petites vacuoles renfermant chacune un ou plusieurs corpuscules métachromatiques et placées à chaque pôle de la cellule (Pl. VIII, fig. de 48 à 57).

Le noyau est unique dans chaque cellule ;

il se trouve situé au centre ; très souvent il apparaît comme une masse sphérique et homogène, mais dans les bonnes préparations il laisse parfois apercevoir un *chromoblaste*, un *nucléoplasme incolore* et une *membrane*. Sa division se produit presque toujours par une coupure transversale du chromoblaste primitif.

Le bourgeonnement se fait le plus souvent aux extrémités terminales de la cellule, mais il peut également s'accomplir sur les côtés latéraux de la cellule ; souvent la naissance des bourgeons coïncide avec la position des noyaux comme Itswanfi l'avait montré, mais il ne paraît pas y avoir là une règle générale.

Outre le bourgeonnement, on remarque souvent un partage de la cellule par une cloison médiane apparaissant au milieu des cellules les plus allongées. Dans quelques cas ce partage est accompagné de phénomènes de dégénérescence ; une portion de la cellule entre en dégénérescence, tandis que la partie active du protoplasme se concentre sur une moitié de la cellule et se sépare du reste par la formation d'une cloison médiane (Pl. VIII, fig. 56).

Au cours du développement, les vacuoles s'élargissent et arrivent à occuper la majeure partie de la cellule, en même temps que les corpuscules métachromatiques augmentent de nombre.

Le glycogène paraît rester localisé dans le protoplasme.

Nous avons donc observé chez l'*Ustilago maydis* une structure à peu près conforme à celle qu'avait décrite Maire; cependant ce dernier n'avait pas remarqué que les zones hyalines entourant les corpuscules métachromatiques au début du développement étaient l'origine des vacuoles et que ces corpuscules étaient presque toujours situés dans l'intérieur des vacuoles.

L'*Ustilago avenæ* possède des conidies levures de dimensions supérieures à celles du précédent. Ses cellules sont tantôt ovales, tantôt très allongées et terminées en pointe à leurs deux extrémités. Dans ces dernières, on constate parfois la formation de cloisons médianes.

Dans les jeunes cellules, on distingue le plus souvent un grand nombre de vacuoles, de taille variable, généralement très petites et disposées d'une manière quelconque dans un protoplasme d'apparence homogène. Les unes contiennent du glycogène, les autres renferment des corpuscules métachromatiques, ces dernières sont ordinairement vers le centre de la cellule. Au fur et à mesure que le développement s'effectue, ces vacuoles se multiplient, augmentent de volume et arrivent à donner au protoplasme une belle structure alvéolaire (Pl. VIII, fig. de 37 à 43).

Le noyau est soit au centre de la cellule, soit contre la membrane. L'hématoxyline de Heidenhain le différencie avec un *nucléoplasme incolore*, un *chromoblaste* souvent excentrique et une *membrane limitante*.

Sa division se fait par le procédé habituel de scission du chromoblaste (Pl. VIII, fig. de 44 à 47).

Cette structure présente un intérêt tout à fait particulier à cause de l'*aspect alvéolaire* du protoplasme. Déjà, dans les cas précédents, nous avons appelé l'attention sur ce caractère du protoplasme, mais le phénomène ne s'était jamais présenté d'une manière aussi caractéristique.

Chez les bactéries, Bütschli et un certain nombre d'auteurs ont vu une structure semblable avec une partie médiane à protoplasme plus fortement coloré et contenant un grand nombre de corpuscules métachromatiques qui n'existent pas dans la couche corticale. L'existence de telle structure chez les levures avec des vacuoles à corpuscules métachromatiques au centre et vacuoles glycogéniques à la périphérie, ces dernières mal délimitées dans leur contour, pourrait peut-être mettre un doute sur le corps central décrit par Bütschli (1); c'est

(1) Le corps central de Bütschli a d'ailleurs été contesté, dans ces dernières années, par plusieurs observateurs. Vjedosky a décrit chez certaines bactéries une structure

du reste l'avis de Kunstler qui a fait des observations comparatives avec les levures.

En outre, nous avons vu combien ces vacuoles étaient changeantes, se multipliant, se fusionnant. Dans ces conditions, on ne pourrait donc pas les considérer comme des organes au sens de de Vries et Van Tieghem (1). Déjà cette observation avait été formulée par Matruchot, à propos de la structure des Morterellées ; c'est également notre opinion.

VIII. — Résumé

Nous avons donc, dans ce chapitre, confirmé les résultats de nos observations antérieures, par un examen plus rapide d'un certain nombre de

assez voisine de celle que nous avons observée chez les levures avec deux vacuoles polaires et un protoplasme très dense au milieu de la cellule. Dans cet espace protoplasmique, l'auteur remarque toujours un petit corps sphérique se colorant plus fortement que le reste du protoplasme qui, selon lui, représenterait le noyau. Il est possible que la structure alvéolaire du protoplasme des bactéries ne se montre, comme chez les levures, qu'à certains stades du développement, et l'existence du corps central est loin d'être démontrée.

(1) Le fait que les vacuoles pénètrent dans les jeunes bourgeons ne paraît pas être suffisant pour les faire regarder comme des hydroleucites ; il est naturel qu'elles s'y introduisent avec le protoplasme.

levures ou de formes levures; quelques-unes n'avaient pas encore été l'objet d'observations histologiques (*T. nigra*, *S. kefir*, *S. apiculatus*).

Comme partout ailleurs, nous avons retrouvé un *noyau de forme très simple*, mais dont la présence est indéniable, et des *corpuscules métachromatiques* presque toujours localisés dans les vacuoles. Enfin, comme nous l'avions fait remarquer antérieurement à propos du *D. species*, il n'existe aucune distinction histologique entre les formes levures (1) des moisissures et les véritables levures, qu'elles appartiennent à un Dematium ou à un Ustilago.

(1) Nous ne parlons ici que des formes levures typiques et non de celles qui s'écartent des vraies levures par leurs caractères morphologiques, telles que les formes dissociées des Mucorinées.

CHAPITRE VIII

Recherches sur les corpuscules métachromatiques.

Nous avons assimilé les corps réfringents, que nous avons si souvent rencontrés dans les vacuoles des moisissures ou des levures, aux *corpuscules métachromatiques* de Babès et aux *grains rouges* de Bütschli. Nous pensons qu'il n'est pas inutile, en terminant cette étude, d'insister sur ces corps, signalés dans beaucoup de micro-organismes qui ont été très diversement considérés sous des noms différents et ont amené sur cette question une inextricable confusion.

Ces corps, ainsi que nous l'avons dit, se caractérisent par leur aspect réfringent, par les mouvements browniens dont ils sont animés, par leur coloration à l'état vivant par le bleu de

méthylène, enfin par la couleur intensive en rouge qu'ils prennent par beaucoup de matières colorantes et notamment par l'hématoxyline et le bleu de méthylène.

Historique. — Les corpuscules métachromatiques furent d'abord découverts chez les Cyanophycées et les Bactériacées. Ernst (1888) est un des premiers qui ait appelé l'attention sur ces corps. Cet auteur observe dans un premier mémoire des corpuscules qui se différencient à l'aide d'une double coloration au bleu de méthylène et au brun de Bismarck : ils se colorent en brun intense et se détachent, sur un protoplasme jaune. Ils ont une forme essentiellement variable ; les plus gros ont l'apect de gouttelettes ; ils sont presque toujours entourés de plus petits. Ils se fusionnent entre eux et les uns paraissent s'accroître aux dépens des autres. Ernst, qui ne les avait remarqués que chez des espèces ne fournissant pas de spores, est amené à leur donner la signification d'organes analogues à des spores.

Dans une étude postérieure, il les retrouve chez des bactéries sporogènes et il observe que les spores de ces organismes résultent de la fusion de ces corpuscules accompagnée d'une modification chimique de leur

substance. Aussi les désigne-t-il sous le nom de *grains sporogènes;* il serait disposé à leur attribuer la valeur de noyaux. Leur résistance à l'action des liquides de digestion, leur division, qu'il croit avoir constatées dans certains cas, l'autorisent à cette conclusion.

Plusieurs années avant Ernst, Neisser (1884) avait déjà décrit des corpuscules analogues. Il remarquait que les organismes pourvus de ces corps manifestaient une plus grande résistance contre la chaleur que ceux qui n'en possédaient pas et inclinait à les considérer comme des spores.

Babès (1889), colorant certaines bactéries et notamment le bacille de la diphtérie à l'aide d'une solution de bleu de méthylène concentrée, différencie également des granules qui se colorent en violet ou en rouge dans un protoplasme bleu. Leur apparition fréquente aux extrémités des bacilles et dans les endroits où se produit la segmentation l'amène à leur attribuer un rôle dans la division cellulaire. Hésitant à en faire de véritables noyaux, il leur donne le nom plus prudent de *corpuscules métachromatiques*, que nous avons conservé.

En même temps, un nombre considérable d'auteurs signalent ces mêmes corps chez les Cyanophycées et chez les Bactériacées et les considèrent très diversement, soit comme des

arthrospores (Hueppe), soit comme des noyaux ou plus ordinairement comme des grains de chromatine disséminés dans le protoplasme (Schmitz, Strasburger, Steinhaus, Zacharias, Warlich, Deinega, Protopopoff, Trambusti et Galeotti, F. Marx, Sjœbring, Hieronymus, Mitrophanow, Schewiakoff, Stockmayer, Lœffler, Klebs, Crouch, Zukal, Palla, Nadson).

Bunge (1893), reprenant les observations de Ernst, démontre que les grains sporogènes de cet auteur sont absolument étrangers à la formation des spores. Il distingue dans les bactéries deux catégories de granules, les uns qui se colorent difficilement et qui par leur concentration constituent les spores; les autres (corpuscules de Ernst et Babès) qui possèdent une grande affinité pour les colorants et ne participent pas à la formation des spores, mais qu'au contraire on retrouve dans le protoplasme non utilisé, après l'apparition des spores.

Bütschli (1890-1896) différencie également dans les mailles du protoplasme des Cyanophycées et des Bactériacées des globules sphériques, qui prennent une coloration rouge par l'hématoxyline et le bleu de méthylène. Ils sont presque tous localisés dans le *corps central* (que Bütschli regarde comme noyau) et pour cela, cet auteur les considère d'abord comme

des grains de chromatine. Dans un second mémoire, il reconnaît qu'ils n'ont pas les propriétés microchimiques de la nucléine, et comme, d'autre part, il les retrouve en dehors du noyau chez différents microorganismes (Diatomées, Flagellées, algues filamenteuses), il renonce à sa première manière de voir.

Lauterborn (1896), dans une étude histologique sur les Diatomées, mentionne la présence de ces grains rouges de Bütschli. Ils sont disposés le plus souvent dans le protoplasme, quelquefois cependant ils occupent certaines vacuoles, dans lesquelles ils sont animés de mouvements browniens. Cet observateur les rapproche, par leur pouvoir de se colorer à l'état vivant par le bleu de méthylène, des *Physodes* de Crato (1), des *Karyoïdes* de

(1) Crato observe chez les Phéosporées et quelques Chlorophycées des corps réfringents placés dans les nœuds d'un protoplasme réticulé et qui sont animés de mouvements browniens. Il les désigne sous le nom de *Physodes*. Ces corps lui paraissent jouer un très grand rôle dans la nutrition de ces algues. Ils se colorent par le bleu de méthylène à l'état vivant.

Crato montre par une série de réactions microchimiques qu'ils contiennent de la phloroglucine. Comme il les retrouve dans l'*Elodea Canadensis* et dans les poils d'*Urtica pilulifera*, il pense que ces corps seraient peut-être très répandus chez les végétaux.

Palla (1) et de certains corps découverts par Raciborski (2) et Schilling chez les plantes aquatiques.

Le fait qu'ils disparaissent pendant la division du noyau lui fait penser qu'ils jouent le rôle de produits de réserve.

Fischer (1897) considère ces granules comme des produits de réserve ou d'assimilation ; il ignore si ce sont des hydrates de carbone ou des matières protéiques.

Kunstler et Busquet (1897) retrouvent les grains rouges chez un très grand nombre de microorganismes (Ciliées, Flagellées, Sporozoaires, urnes parasites des Siponcles) et pensent qu'ils résultent simplement d'un phénomène de *diffraction*, sans présenter aucune autre valeur morphologique commune. Ces colorations rouges s'observeraient en effet dans des condi-

(1) Palla remarque dans les Conjuguées des corps situés autour du chromatophore dans le voisinage du noyau, qui se colorent par l'éosine et qui sont animés de mouvements. Il estime que ce seraient peut-être des corps nucléaires comparables aux micronucleus des infusoires. Il leur donne le nom de Karyoïdes.

(2) Raciborsky et Schilling ont découvert chez certaines plantes aquatiques (feuilles de Myriophyllum) des granules réfringents ressemblant à des globules d'huile et placés autour du noyau. Ces corps se colorent à l'état vivant par le bleu de méthylène et présentent avec les solutions de vanilline la réaction de la phloroglucine.

tions très diverses, non seulement en présence de presque toutes les matières colorantes, mais par l'action de certains réactifs chimiques et même dans le protoplasme vivant.

Matruchot et Molliard (1900) constatent dans le *Stichococcus bacillaris* la présence de grains rouges, qui augmentent de nombre, lorsqu'on ajoute à l'eau dans laquelle il vit une certaine quantité de sucre ou de peptone. Aussi croient-ils pouvoir leur attribuer le rôle de matières de réserve.

Les corpuscules métachromatiques donnèrent lieu, dans ces dernières années, à un grand nombre de travaux chez les bactéries. Vlad Rusicka, Ziemann, Wagner, Meyer, Feinberg, Nakanishi, Hinze ont décrit des noyaux qui paraissent se rattacher à ces corps. Tout dernièrement encore H. Marx et Woithe (1900) dans une longue étude sur les corps de Ernst et Babès montrent qu'ils n'apparaissent que dans les meilleures conditions et au moment du maximum de vitalité des bactéries. Ils les considèrent comme des grains de chromatine dont la différenciation ne se produirait qu'à certains moments.

Leur présence serait en relation avec la virulence d'une culture ; elle pourrait servir de critérium du degré de virulence des bactéries et être utilisée dans le pronostic des maladies.

Cette assertion fut longuement discutée dans

ces derniers temps. Krompecher, Ascoli, Gauss (1901-1902) reprirent la question et n'arrivèrent pas à vérifier cette prétendue loi.

Krompecher (1901) distingue dans les bactéries deux catégories de granules : les uns sont contenus dans un protoplasme périphérique et se teignent en bleu foncé par le bleu de méthylène ; ce seraient les corps de Ernst et Babès. Les autres, placés dans une zone hyaline qui occupe le centre de la cellule, prendraient une coloration rouge par le bleu de méthylène. Il donne à ces derniers le nom de corpuscules métachromatiques ; ce sont eux qui formeraient les spores en se concentrant. Au moment où ils naissent, ils sont très petits et ne s'aperçoivent que par une coloration rouge uniforme qu'ils donnent au protoplasme hyalin du centre de la cellule (1).

Ces divergences d'appréciation décident Ernst (1902) à reprendre ses recherches sur la structure des bactéries. Il étudie un grand nombre de bactéries et de champignons, qu'il colore à l'état vivant au moyen du rouge

(1) Ces deux catégories de corps nous paraissent être identiques; leur distinction reposerait peut-être uniquement sur les variations de couleur que présentent les corpuscules métachromatiques vis à vis du bleu de méthylène qui donne tantôt des colorations bleu foncé, tantôt des colorations violettes.

neutre ou du bleu de méthylène. Il remarque de nouveau les corps qu'il avait précédemment signalés : ces corps, très variables par leurs dimensions, sont animés de mouvements dans l'intérieur des vacuoles dans lesquelles ils sont presque toujours contenus ; les uns se colorent intensivement, les autres ne fixent pas les matières colorantes. Il constate qu'ils sont capables de se diviser (1). Souvent aussi ils sont expulsés de la cellule, traversent la membrane et on les retrouve dans le milieu ambiant, tout autour des cellules (2).

Ernst abandonne sa première opinion et les considère désormais comme des *plasmosomes* analogues à ceux d'Altmann et d'Arnold.

Ces mêmes corps ont été souvent retrouvés chez un certain nombre de champignons ; ils y ont été jusqu'ici fort mal étudiés. Beaucoup d'observateurs, s'occupant uniquement de mor-

(1) Nous avons observé de notre côté des figures où les corpuscules métachromatiques paraissaient se diviser et il est possible, qu'au moment de leur dissolution, leur diminution de taille provienne en partie de leur fragmentation.

(2) Le fait nous paraît étrange ; nous avons bien remarqué dans les vieilles cultures des cellules entourées d'un grand nombre de granules réfringents, mais ces granules ne se coloraient jamais et nous ne nous sommes pas demandé s'ils provenaient d'une sécrétion des cellules ou du milieu de culture. Quoi qu'il en soit, il nous paraît inadmissible qu'ils soient dus à une expulsion des corpuscules métachromatiques.

phologie, ont signalé des granules réfringents animés de mouvements browniens dans l'intérieur des vacuoles, mais sans se préoccuper de leur signification.

Dangeard paraît les avoir pris dans beaucoup de cas pour des globules d'huile avec lesquels ils ont une grande ressemblance. Cependant dans un dernier mémoire sur le *Polyphagus Euglenæ*, il découvre des corps d'apparence globulaire qu'il avait d'abord pris pour des globules oléagineux et qu'il considère maintenant comme des éléments de nature et de rôle inconnus qu'il désigne sous le nom de *cœnosphères*. Ces corps, bien qu'ils ne paraissent pas avoir absolument les mêmes caractères que les corpuscules métachromatiques, pourraient peut-être s'y rattacher.

Bütschli constate la présence des grains rouges chez quelques champignons mycéliens.

Babès et Protopopoff avaient également retrouvé chez l'*Actinomyces* les mêmes granules qu'ils avaient différenciés chez les bactéries.

Vlad-Rusicka, Ziemann, Krompecher, mentionnent chez certains champignons la présence de corpuscules fortement colorables par le bleu de méthylène.

Maire et Guégen figurent les corpuscules métachromatiques l'un chez l'*U. maydis*, l'autre chez le *P. glaucum*.

Biffen observe dans une moisissure trouvée par lui dans la noix de coco des corps qu'il distingue des noyaux et qu'il décrit comme grains de protéine. C'est très probablement aussi à ces corpuscules métachromatiques qu'il faut rattacher les grains de protéine trouvés par Hartog chez les Saprolégniaçées.

Beaucoup d'auteurs les ont signalés chez les levures, en leur donnant des significations diverses, mais fort peu ont eu l'idée de les comparer avec les granules observés chez les bactéries. Ils les considèrent, comme nous l'avons vu au cours de notre travail, soit comme des grains de chromatine, soit comme des produits de dégénérescence, soit comme des globules d'huile, soit enfin comme des produits de réserve (protéine, ou matière nucléo-albuminoïde). (Krasser, Raum, Mœller, Hieronymus, Fischer et Brebeck, Eisenschitz, Curtis, Buscalioni, Janssens et Leblanc, Casagrandi, Wager, Kunstler, R. et W. Albert, Ernst).

Tokishige a décrit chez une levure pathogène des globules de taille variable qu'il prend pour des spores et qui paraissent être aussi des corpuscules métachromatiques. (Comparez les figures de la planche IX à celles de Tokishige.)

Seuls, Raum et Kunstler ont cherché à les mettre en relation avec les corpuscules des bactéries, le premier en les rapprochant des grains

sporogènes de Ernst, l'autre en les assimilant aux grains rouges de Bütschli.

Les corpuscules métachromatiques se rencontrent donc chez un grand nombre de microorganismes (protozoaires, algues, champignons), et paraissent avoir un rôle important dans leur vie.

Action des colorants. — Nous avons vu précédemment que ces corpuscules prenaient une coloration rouge avec la plupart des matières colorantes.

Le bleu de méthylène les colore à l'état vivant comme l'a fait remarquer Lauterborn. Si l'on porte, en effet, quelques cellules vivantes dans une solution de bleu de méthylène, le protoplasme reste ordinairement incolore, et les corpuscules métachromatiques fixent la couleur, tout en conservant leurs mouvements browniens dans l'intérieur des vacuoles.

Ces corpuscules métachromatiques ne paraissent pas jouir des mêmes propriétés avec les autres matières colorantes.

Un fait qui mérite d'appeler notre attention est la variabilité que peut présenter la coloration de ces corps. Certains fixateurs, tels que l'alcool, le sublimé ou la chaleur, sont très favorables à leur coloration; au contraire l'acide picrique, la solution de Flemming peu-

vent l'entraver et il est nécessaire de soumettre les objets fixés par ces procédés à un très long lavage, si l'on veut obtenir leur différenciation.

De plus les colorations peuvent, avec une même matière colorante, donner des teintes très différentes suivant la durée de la coloration ou de la décoloration.

L'hématoxyline donne aux corpuscules métachromatiques, au bout de quelques minutes, une teinte rouge pourpre ; si l'on prolonge un peu plus longtemps la durée de la coloration, la teinte rouge s'assombrit et passe au rouge foncé ou noirâtre. La partie phériphérique de ces corpuscules, lorsqu'ils atteignent un diamètre un peu élevé, apparaît toujours avec une teinte beaucoup plus foncée que le centre.

Ces corps se différencient les premiers avec l'hématoxyline, avant même que le protoplasme et le noyau aient commencé à subir l'action du colorant, et ils résistent les derniers à la décoloration. Les solutions d'alun à 1 p. 100 les décolorent cependant assez facilement, en conservant la coloration du noyau.

Avec l'hématoxyline au fer, les corpuscules métachromatiques se colorent intensivement en noir, mais presque toujours ils disparaissent avant le noyau lorsque les préparations ont été décolorées longtemps à l'alun de fer.

Le bleu de méthylène fournit des colorations extrêmement variables : tantôt les corpuscules apparaissent d'un bleu intense, tantôt ils ont un reflet violet, tantôt enfin ils sont nettement rouges et cette inégalité de coloration peut exposer à de graves erreurs. On peut dire d'une manière générale qu'une action trop rapide du colorant sur la préparation donne une teinte bleu foncé ou violette, alors qu'une action plus longue produira la coloration rouge caractéristique (Pl. IX, fig. 17 à 25).

De même que l'hématoxyline, le bleu de méthylène fait apparaître les corpuscules métachromatiques avant que le reste de la cellule ait commencé à fixer la couleur. Mais contrairement à ce que l'on observe avec l'hématoxyline, leur décoloration se fait très rapidement et précède celle du protoplasme. Il ne faut donc pas prolonger trop longtemps le lavage ; cependant si l'on prend la précaution de le surveiller au microscope, on peut arriver à un point où les corpuscules se montrent tous colorés en rouge pâle avec une enveloppe d'une nuance plus intense et d'un bleu violacé.

On obtient alors de très intéressantes préparations où ces corpuscules apparaissent très nettement avec leurs formes et leurs caractères spécifiques. Tantôt on en trouve d'énormes,

ordinairement sous forme de grosses boules sphériques, rarement ovales; quelquefois leur contour est irrégulier et cette irrégularité paraît occasionnée par une fusion récente de plusieurs de ces corps. Tantôt ce sont de petits granules assemblés les uns autour des autres et se disposant à se fusionner.

Dans le cas où il se produit des phénomènes de dissolution, ils paraissent prendre une couleur rouge ou violette plus accentuée, puis diminuent de taille et de nombre; on ne les voit plus que sous forme de petites granulations de couleur violacée, englobées d'une substance paraissant liquide, qui se colore avec la même nuance rouge pâle que nous venons de signaler au centre de ces corps, dans les préparations bien décolorées, obtenues avec le bleu de méthylène. Il semble donc que dans les stades de dissolution la coloration devienne beaucoup plus franchement rouge.

De même, lorsqu'on presse une préparation colorée par le bleu de méthylène ou par l'hématoxyline, de façon à écraser les corpuscules métachromatiques, ceux-ci prennent une nuance d'un rouge plus accusé.

Avec le bleu polychrome la coloration de ces corpuscules métachromatiques est toujours d'un rouge vif.

Le vert de méthyle produit des colorations

d'abord d'un vert intense, qui prennent une nuance violacée, rarement rougeâtre, si l'on prolonge la coloration. La teinte violette ou rougeâtre est également plus accentuée au centre de ces corps qu'à la périphérie.

Le violet de gentiane, le violet de méthyle colorent également les corpuscules métachromatiques avec la couleur rouge caractéristique. La fuchsine, le rouge de Magenta, le carmin, la safranine les teignent en rouge foncé.

Les mélanges de fuchsine et de bleu de méthylène ou de vert de méthyle donnent au protoplasme une couleur violette et aux corpuscules une teinte vert ou bleu intense, si le vert de méthyle ou le bleu de méthylène sont en quantité suffisante ; dans le cas contraire, les corpuscules fixent la fuchsine.

Les mélanges de bleu de méthylène et d'éosine colorent le protoplasme en violet et les corpuscules en bleu intense avec parfois des reflets violacés.

Le brun de Bismarck n'agit sur les corpuscules métachromatiques que lorsque la préparation est chauffée et leur donne alors une belle coloration d'un brun rougeâtre avec une paroi plus sombre que le centre.

Les mélanges de brun de Bismarck et de bleu de méthylène teignent le protoplasme en jaune et les corpuscules se détachent en brun foncé.

Dans les doubles colorations à l'iodo-iodure de Gram et au vert de méthyle, employées par nous pour différencier à la fois les corpuscules et le glycogène, ces corps prenaient également une teinte d'un brun foncé.

La nigrosine paraît donner aux corpuscules métachromatiques une très légère nuance noirâtre. L'éosine, le rose de Bengale, le rouge du Congo, les laissent toujours incolores.

Cette longue énumération des caractères de ces corps vis-à-vis des colorants était indispensable pour essayer d'éclaircir le problème de cette métachromasie qui les caractérise.

Nous avons vu que Kunstler et Busquet l'attribuent à un simple phénomène de diffraction et non à une coloration. Ces phénomènes de diffraction très fréquents dans le protoplasme des microorganismes laisserait à penser, d'après eux, que ces corps ne correspondraient à aucun organe spécifique de la cellule. Nos observations ne peuvent laisser aucun doute sur leur existence et sur leur haute importance, puisqu'ils atteignent quelquefois des dimensions considérables et se distinguent très facilement à l'état frais. Mais pour ce qui regarde l'explication de cette coloration, la question est un peu plus délicate. Il ressort de l'examen que nous venons de faire que cette teinte n'est pas toujours rouge : elle peut être bleu foncé

avec le bleu de méthylène et verte avec le vert de méthyle suivant certaines circonstances. Avec les mélanges de brun de Bismarck, de bleu de méthylène avec le vert de méthyle après traitement à l'iodo-iodure de potassium, elle est d'un brun noirâtre ; avec l'hématoxyline de Heidenhain, elle est noir foncé. Le fait de la coloration est donc indéniable.

Quant à la métachromasie, elle est sujette à de grandes variations, mais des observations méticuleuses nous montrent en réalité, dans chacun de ces corps, une partie centrale qui paraît surtout prendre une coloration rouge, alors que la partie périphérique apparaîtrait avec une nuance beaucoup plus voisine de celle du colorant employé. Il semble donc que la coloration puisse s'effectuer comme s'il existait dans ces corpuscules un mélange de deux substances, dont l'une, plus abondante au centre, jouirait de propriétés métachromatiques vis-à-vis de beaucoup de colorants, et dont l'autre se colorerait plus normalement. Suivant que l'une serait plus colorée que l'autre, ils paraîtraient plus ou moins métachromatiques et ainsi s'expliqueraient ces singulières variations que nous avons observées avec une même matière colorante. Le fait que la couleur rouge est toujours plus manifeste lorsqu'on écrase la préparation et dans les phénomènes de disso-

lution paraît d'accord avec cette manière de voir.

D'autre part, si on fait varier le point de l'objectif dans une préparation colorée, la couleur rouge de ces corpuscules conserve toujours la même teinte, sans subir aucune modification. D'un autre côté, nous avons essayé l'action d'un grand nombre de réactifs chimiques, qui, contrairement à ce qu'avaient cru remarquer Kunstler et Busquet, ne nous ont jamais donné de phénomènes de diffraction. Nous croyons donc pouvoir affirmer, bien que l'on ne connaisse aucune substance capable de faire virer au rouge le bleu de méthylène (1), qu'il s'agit bien, comme le pensait Bütschli, d'un phénomène chimique qui modifierait les matières colorantes et non de phénomènes physiques comme le voudraient Kunstler et Busquet.

Action des réactifs chimiques. — Nous avons cherché à nous éclairer sur la nature de ces corps en observant la manière dont ils se comportent devant quelques réactifs chimiques.

(1) Massart a attribué cette coloration à la présence de rouge de méthylène dans le bleu de méthylène, mais s'il en était ainsi, on ne remarquerait pas des phénomènes analogues avec d'autres matières colorantes (violet de gentiane, hématoxyline, vert de méthyle).

Nous avons déjà dit qu'ils ne possédaient pas les propriétés de la nucléine. Ces faits sont loin de correspondre aux réactions observées par les différents auteurs qui les ont étudiés : les uns ne leur trouvent aucune analogie avec la nucléine; d'autres, au contraire, constatent qu'ils montrent des réactions voisines de celles de la nucléine.

Ces réactions microchimiques sont en effet fort délicates. Beaucoup d'auteurs ont cherché à colorer les cellules après les avoir traitées par divers réactifs chimiques; or nous avons vu que ces corpuscules étaient susceptibles de perdre très rapidement leur affinité pour les matières colorantes et souvent de ne pas la retrouver même après un lavage prolongé. Il est donc nécessaire de ne pas attacher trop d'importance aux colorations, qui ne prouvent pas grand' chose et de choisir pour ces études des organismes suffisamment gros pour pouvoir s'appuyer exclusivement sur un examen sans coloration. Enfin il faut tenir compte de la membrane qui dans beaucoup de cas peut être un obstacle sérieux à la pénétration des réactifs. Aussi ne peut-on attribuer qu'une valeur très relative à la microchimie et ceci nous permettra de passer rapidement sur cette question.

Quoi qu'il en soit, ces corps nous ont paru résister après un traitement de quarante-huit

heures dans la pepsine additionnée d'acide chlorhydrique et à une température de 35°. Au contraire, Raum, Lauterborn, Janssens et Leblanc ont constaté leur digestion par la pepsine. Cependant dans ces derniers temps, R. et W. Albert, ayant découvert un procédé pour tuer les cellules de levures sans altérer leurs diastases, trouvent dans le *S. cerevisiæ* une enzyme protéolytique d'une très grande énergie. En plaçant les cellules de levures tuées à l'aide de ce procédé dans l'eau distillée à 25°, cette enzyme digère toutes les substances albuminoïdes contenues dans les cellules. Ils colorent ces dernières à tous les stades du phénomène et constatent dans le protoplasme des granules assimilables aux granules de Hieronymus qui résistent à l'enzyme. Ils les considèrent donc comme étant peut-être de nature nucléique.

D'autre part, nous avons obtenu avec le réactif de Millon une teinte rose du protoplasme, mais jamais de corpuscules. Cet ensemble de faits ne paraît pas devoir les faire considérer comme des matières protéiques.

Lauterborn les rapproche, comme on a vu, des physodes de Crato, qui d'après cet auteur seraient surtout formés de phloroglucine. Nous avons essayé avec beaucoup de soin chez un grand nombre de champignons les réac-

tions indiquées par Crato et entre autres la vanilline dissoute dans l'acide chlorhydrique, mais jamais nous n'avons pu constater aucun indice de la présence de cette substance dans les corpuscules métachromatiques. D'autre part, le fait que les physodes se colorent à l'état vivant par le bleu de méthylène ne nous paraît pas suffisant pour nous permettre d'établir une liaison entre ces deux catégories de corps.

Variations dans les cultures. — Nous avons pensé que l'on pourrait peut-être recueillir d'utiles renseignements sur ces corps, par l'examen histologique de cultures provenant de milieux de composition chimique variée. Pour cela nous avons employé le liquide Raulin, que nous avions remarqué comme très favorable à leur production. Nous supprimions les matières organiques : sucre, acide tartrique; ou bien nous éliminions tous les corps azotés (azotate d'ammoniaque, phosphate d'ammoniaque, sulfate d'ammoniaque); nous prenions certaines précautions pour éviter autant que possible les impuretés (1) (lavage du flacon et séjour des spores à ensemencer dans

(1) Il est évident que les liquides ainsi composés ne pouvaient être que d'une pureté très relative. D'ailleurs, s'ils avaient été chimiquement purs, le champignon n'aurait pas trouvé les aliments nécessaires pour se développer.

l'eau distillée, etc.), et nous comparions les résultats obtenus à une culture témoin sur liquide Raulin complet.

Nous avons fait ces expériences avec un grand nombre de champignons, en choisissant de préférence ceux qui, par l'abondance des corpuscules métachromatiques, par leur dimension et leur facilité d'alimentation, présentaient les conditions les plus favorables (*Sterig. nigra, Asp. variabilis, P. glaucum, D. species*), quelques levures ne produisant pas de spores (*S. myc. vini, S. m. cerevisiæ, Mon. candida, End. albicans*).

Malheureusement ces expériences ne nous donnèrent pas les résultats que nous attendions.

Les champignons cultivés sur le liquide Raulin complet fournissaient une grande abondance de corpuscules métachromatiques et ceux ensemencés sur les liquides sans matières organiques ou sans azote en donnaient également, mais en très faible quantité. Cependant il nous a semblé dans certains cas que ces corpuscules étaient légèrement plus nombreux dans les liquides renfermant de l'azote que dans ceux qui en étaient dépourvus. D'autre part, les liquides très riches en azote (peptone) en produisaient une quantité un peu plus forte que les milieux où l'élément dominant était hydrocarboné.

Rôle. — On a beaucoup discuté sur le rôle des corpuscules métachromatiques. En dehors des nombreux auteurs qui les ont confondus avec des grains de chromatine, il en est quelques-uns qui les ont pris pour des produits de dégénérescence protoplasmique, très peu les ont considérés comme matières de réserve (Fischer, Lauterborn, Matruchot et Molliard).

L'ensemble de nos observations paraît cependant leur attribuer définitivement ce rôle. Leur présence dans les filaments en voie de croissance, leur pénétration dans les bourgeons, leur abondance dans les parties fructifères des moisissures, leur absorption dans l'épiplasme des Ascomycètes et des levures, leurs phénomènes de dissolution apparaissant régulièrement chez les levures avant la formation des spores, tout est d'accord avec cette manière de voir. En outre, la quantité de ces corpuscules, de même que celle du glycogène, est très variable d'une cellule à l'autre, et dans une même culture, on trouve des cellules qui en sont largement pourvues et d'autres qui n'en contiennent pas ou très peu. Elle peut même varier d'une espèce à l'autre et tandis que certains champignons, tels que le *D. species*, en renferment une richesse considérable, d'autres, tels que l'*O. lactis* et le *Sch. octosporus*, en présentent fort peu.

Les colorations au bleu de méthylène nous

donnent sur ce point des renseignements très intéressants. Lorsqu'on traite un fragment de mycélium de Dematium à l'aide de ce colorant et qu'on l'examine avec soin, on aperçoit, outre les parties où le protoplasme se teint nettement en bleu clair, certains endroits des filaments, où tout le protoplasme prend une couleur violette comme si les corpuscules métachromatiques s'étaient dissous en un liquide imprégnant ce protoplasme (Pl. IX, fig. 24). Nous avons constaté des faits semblables dans les têtes fructifères des Aspergillus et du *Pen. glaucum*, et dans les jeunes spores des levures. Ces faits doivent être rapprochés des phénomènes de dissolution que nous avons préalablement décrits dans la sporulation et que nous avons retrouvés à certains stades de développement du *M. candida*.

Enfin lorsqu'on place une portion de mycélium ou une certaine quantité de levures dans de l'eau distillée, on remarque que les corpuscules métachromatiques diminuent de nombre et de taille et qu'en revanche le protoplasme tout entier prend une coloration violette, comme si ces corps subissaient ici encore une dissolution. Au bout de quarante-huit heures, il n'en existe ordinairement plus qu'à l'état exceptionnel et la couleur violette du protoplasme a disparu.

Cependant ces corps, dont le nombre diminue beaucoup à mesure que les cultures vieillissent ou cessent de croître, semblent toutefois pouvoir subsister fort longtemps après la fin du développement. Nous avons examiné, à ce point de vue, un grand nombre de cultures de divers champignons ; au bout de plusieurs mois, nous trouvions des cellules ne contenant plus que des globules d'huile, d'autres qui avaient conservé leur structure vacuolaire, mais ne renfermaient plus aucune trace de corpuscules métachromatiques ; ailleurs des globules d'huile, un certain nombre de corpuscules métachromatiques et du glycogène ; d'autres cellules enfin montraient un protoplasme coloré en violet par le bleu de méthylène et possédaient un peu de glycogène.

Ces faits correspondent en somme à ceux qu'on a observés chez les bactéries où la présence de ces corps semble liée avec le maximum de vitalité de l'organisme, et si nous n'avons pas encore pu nous rendre compte de leur nature chimique, au moins avons-nous certaines raisons de les considérer comme des produits de réserve, ayant dans la vie des levures un rôle peut-être aussi important que le glycogène.

RÉSUMÉ

Nous sommes donc arrivé par des observations précises à déterminer quelques-uns des caractères essentiels des corpuscules métachromatiques ; ces caractères peuvent se résumer de la manière suivante.

1° Ces corps sont très variables de formes et de dimensions; cependant la plupart du temps ils sont sphériques. Ils paraissent pouvoir se fusionner les uns avec les autres.

2° Leur coloration présente une grande variabilité, mais ils se comportent comme s'ils étaient constitués de deux substances, dont l'une, localisée au centre, paraît surtout métachromatique.

3° A certains stades du développement ces corpuscules subissent des phénomènes *de dissolution* dans l'intérieur des vacuoles qui les renferment et paraissent *être absorbés par le champignon.*

4° Ils doivent jouer le *rôle de substances de réserve*, mais *leur nature reste inconnue.*

CHAPITRE IX

Considérations générales et conclusions

I. — État actuel de la question

Malgré de très nombreuses observations publiées depuis une vingtaine d'années, la question de la structure des levures, et particulièrement de leur noyau, est restée très obscure. La plupart des auteurs qui ont étudié ce sujet ont abouti à des conclusions contradictoires. Les uns, tels que Mœller, Buscalioni, Bouin, Janssens et Leblanc admettent l'existence d'un noyau. Pour d'autres, ces organismes contiendraient des granules fortement colorables, disséminés dans le protoplasme, et que la plupart considèrent comme des grains de chromatine (la présence de la nucléine ayant été démontrée

par l'analyse de Kossel); tels sont : Raum, Hieronymus, Eisenschitz, Curtis, Macallum.

Cependant Wager dans un travail très précis a paru un moment résoudre ce problème si complexe du noyau des levures. Il trouve dans les cellules des levures un organe sphérique et homogène (noyau des auteurs) qu'il considère comme un nucléole. Ce corps est toujours accolé à la vacuole, cette dernière renfermant des granules fortement colorables qui, d'après lui, représenteraient des éléments chromatiques.

Le noyau de ces organismes élémentaires serait donc réduit à l'état d'une simple vacuole remplie de granules chromatiques et d'un nucléole périphérique. Cet état représenterait un stade primitif du développement phylogénétique du noyau. Wager, ayant cru remarquer une organisation analogue chez une Mucorinée, pense que cette structure serait peut-être commune aux champignons inférieurs.

II. — Méthodes suivies par nous

Nous avons cherché à vérifier ces observations et nous avons essayé par de méticuleuses recherches à débrouiller cette question si con-

fuse. Pour cela, nous nous sommes attaché à observer de très près les différents stades du développement cytologique de moisissures qui, par leur dimension, présentaient plus de commodité que les levures, et à en différencier méthodiquement les éléments figurés de la cellule. Afin d'éviter les chances d'erreur, au lieu de ne nous servir que d'un seul procédé de fixation et de coloration, nous en avons toujours employé comparativement un très grand nombre.

Partant de cette méthode, nous avons comparé les résultats ainsi obtenus avec ceux donnés par les levures dans des conditions analogues. Nous avons trouvé d'excellents types de moisissures avec le *Dematium (species)* et l'*O. lactis*, qui présentent dans leur développement des formes de levures dont on pouvait comparer la structure à celle du mycélium et à celle des véritables levures.

III. — Résultats

A. *Moisissures (Dematium species. Oïdium lactis).* — Au début de son développement, le *Dematium species* présente un protoplasme d'une apparence homogène, parfois légèrement

granuleux. Ce protoplasme se creuse peu à peu de petites vacuoles dans lesquelles sont contenus quelques granules de formes très variables, mais dont les plus gros sont animés de mouvements browniens et sont visibles à l'état frais, sous forme de globules réfringents, rappelant des gouttelettes d'huile. Ces granules sont disposés régulièrement dans chaque vacuole, soit sous forme de grosses sphérules, soit à l'état d'agglomérations de très petits éléments, offrant dans leur ensemble un aspect souvent réticulé, se rapprochant des réseaux chromatiques des noyaux. Ils apparaissent d'autant plus nombreux que le développement du champignon est plus actif et que les conditions sont plus favorables.

Au moment de la formation des conidies levures et de leur bourgeonnement, on remarque qu'une partie de la vacuole se trouvant immédiatement au-dessous de leur point de naissance envoie un diverticulum, qui s'introduit dans les jeunes bourgeons, entraînant avec lui une certaine portion des granules.

Ces granules se caractérisent facilement par leur coloration rouge avec l'hématoxyline et le bleu de méthylène, qui offre un des plus beaux exemples de métachromasie. Cette propriété ainsi que tous leurs caractères nous les ont fait assimiler à des corps souvent rencontrés chez

les Bactériacées, que Babès désigne sous le nom de corpuscules métachromatiques et auxquels Bütschli a donné le nom de grains rouges. Nous avons conservé la première désignation en raison de sa priorité.

Au fur et à mesure que le champignon se développe, les vacuoles s'accroissent, se fusionnent, et finissent par remplir la totalité des articles, le protoplasme étant réduit à l'état d'une mince couche pariétale. Les corpuscules métachromatiques augmentent de nombre, se fusionnent et constituent de gros globules sphériques remplissant les vacuoles et pouvant atteindre des dimensions considérables.

A certains endroits, ces corpuscules paraissent disparaître et le protoplasme coloré avec le bleu de méthylène, ordinairement bleu, prend une teinte violacée, qui paraît résulter de leur dissolution.

Le *Dematium species* ne renferme qu'exceptionnellement du glycogène et lorsque celui-ci existe, il se diffuse dans l'intérieur des vacuoles.

Dans les vieilles cultures, le protoplasme entre graduellement en dégénérescence et se transforme en globules d'huile qui se distinguent des corpuscules métachromatiques par leur incolorabilité vis-à-vis des matières colorantes et par leurs propriétés chimiques. Les corpuscules métachromatiques disparaissent en

grande partie. Par la manière dont ils se comportent dans le développement du champignon, ces corps paraissent donc jouer le rôle de matières de réserve.

Les noyaux se distinguent des corpuscules métachromatiques par leur forme et leurs dimensions à peu près constantes. Le procédé de Heidenhain permet de les mettre en évidence avec beaucoup de netteté. L'hémalun différencie très bien les granulations métachromatiques qu'il colore en rouge vif, des noyaux qui apparaissent en bleu avec une teinte un peu plus pâle.

Ces noyaux sont en nombre variable dans chaque article. Ils sont logés dans les espaces protoplasmiques qui séparent les vacuoles. Rarement ils sont en contact avec les vacuoles.

Leur constitution est simple : un nucléo-hyaloplasme incolore entouré d'une membrane colorée et un corps sphérique accolé à la membrane, qui paraît constituer la masse chromatique du noyau. Nous désignons ce corps, considéré souvent comme nucléole, sous le nom peut être plus correct de chromoblaste.

Ces noyaux ressemblent beaucoup à ceux qui ont été représentés dans le myoélium des Ascomycètes et des Basidiomycètes.

La division s'effectue par un procédé très simple que certains auteurs ont considéré

comme un mode intermédiaire entre l'amitose et la mitose. Il se scinde d'abord en deux parties, ayant quelquefois la forme de demi-disques se regardant par leur face diamétrale et entourées d'une même gaine de nucléoplasme; puis le nucléoplasme se sépare à son tour et donne lieu à la formation de deux noyaux distincts. Nous avons obtenu de très belles colorations de ces phénomènes et comme dans aucun cas nous n'avons pu apercevoir la plus petite trace de différenciation dans la chromatine pendant ces stades, nous nous croyons autorisé à faire rentrer cette division dans la catégorie des amitoses.

Les formes levures possèdent la même structure. Il n'existe typiquement qu'un seul noyau par cellule. Ce noyau est situé ordinairement au centre, chacun des deux pôles étant occupé par une vacuole chargée de corpuscules métachromatiques.

La structure de l'*Oïdium lactis* diffère peu de celle du *Dematium species*, mais tandis que le champignon précédent présentait une richesse exceptionnelle de corpuscules métachromatiques, l'*O. lactis* n'en contient qu'une très petite quantité. Au contraire il renferme une grande abondance de glycogène localisé dans les vacuoles.

Les oïdies et les formes levures de cette moi-

sissure ressemblent beaucoup au *Schizosaccharomyces pombe*, mais s'en distinguent par leur structure toujours plurinucléée.

B. *Levures.* — Les levures nous ont montré une structure absolument conforme à celle que nous venons de décrire chez ces deux moisissures : corpuscules métachromatiques localisés dans les vacuoles et noyau nettement caractérisé.

Protoplasme. — Elles montrent dans les premiers stades de leur développement un protoplasme d'apparence homogène, dans lequel naissent de petites vacuoles contenant quelques corpuscules métachromatiques. Dans la suite ces vacuoles augmentent de volume; leur ensemble offre quelquefois un aspect alvéolaire rappelant les structures décrites par Bütschli ; le plus souvent elles se fusionnent en une seule vacuole qui contient alors un grand nombre de corpuscules métachromatiques de formes et de dimensions très variables. C'est cette vacuole et les corpuscules qu'elle renferme que Wager a considérés comme partie intégrante du noyau.

On remarque souvent une curieuse localisation du glycogène et des corpuscules métachromatiques dans des vacuoles distinctes que

Wager avait déjà observée en décrivant des vacuoles nucléaires et des vacuoles glycogéniques.

Cette particularité paraît donc indiquer une spécialisation dans les fonctions physiologiques du protoplasme. Toutefois cette distinction n'est pas toujours aussi marquée et il n'est pas rare de rencontrer des vacuoles à corpuscules métachromatiques imprégnées d'une petite quantité de glycogène.

Chez le *S. cerevisiæ* où nous avons suivi très soigneusement le développement dans le liquide de Mayer, la vacuole à corpuscules métachromatiques existe seule au début et ce n'est qu'au bout de vingt-quatre ou quarante-huit heures que naît à côté d'elle une vacuole glycogénique qui augmente progressivement et repousse la vacuole primitive à la périphérie de la cellule.

Cette dernière finit par disparaître et les cellules sont alors transformées en de véritables glandes à glycogène, constituées d'une mince couche protoplasmique, accolée à la membrane avec quelques corpuscules métachromatiques, et d'une énorme vacuole glycogénique occupant tout le reste de la cellule. Dès que la fermentation commence à se ralentir, cette vacuole diminue peu à peu de volume, la vacuole à corpuscules métachromatiques se reforme et les cellules reprennent leur état primitif.

Dans les levures allongées, la vacuole à corpuscules subsiste d'ordinaire pendant tout le développement et il se forme soit aux deux pôles soit en un endroit indéterminé de la cellule des vaouoles renfermant du glycogène.

Les vacuoles glycogéniques contiennent parfois de très petites granulations capables de se colorer légèrement. Il est possible que ce soit une coloration partielle du glycogène.

Ces diverses dispositions, bien qu'assez générales, ne méritent cependant pas qu'on leur accorde trop d'importance, car elles dépendent de la composition chimique du milieu, qui favorise ou entrave la formation du glycogène, et peut-être bien aussi de certaines influences physiques. Retenons toutefois que les vacuoles sujettes à de grandes variations ne paraissent pas pouvoir être considérées comme des hydroleucites.

Dans les cultures âgées, on observe des phénomènes de dégénérescence analogues à ceux que nous avons remarqués chez les moisissures. Le protoplasme se transforme graduellement en globules d'huile, et les corpuscules métachromatiques diminuent beaucoup.

Ces globules d'huile se distinguent difficilement des corpuscules métachromatiques. Certains auteurs les ont confondus, considérant ces deux catégories de corps comme des globules d'huile (Casagrandi).

Un procédé de double coloration, à l'hémalun et à l'acide osmique, nous a permis de les différencier, en brunissant les globules d'huile et en colorant les corpuscules métachromatiques en rouge. D'ailleurs les premiers ne fixent jamais les colorants nucléaires et possèdent une plus grande consistance et une moindre réfringence que les globules d'huile.

Noyau. — Le noyau a beaucoup de ressemblance avec celui que nous avons trouvé chez les moisissures. Il se différencie également en bleu mat avec l'hémalun, et l'hématoxyline de Heidenhain permet d'apercevoir les détails de sa structure. Sa présence est donc indubitable.

Ce noyau correspond aux corps considérés comme tels par Moeller, Buscalioni, Bouin et au nucléole de Wager.

Les noyaux décrits par Janssens et Leblanc paraissent au contraire dans la plupart des cas se rattacher aux vacuoles à corpuscules métachromatiques.

Le noyau est toujours unique par cellule ; il est situé soit au centre, soit à la périphérie de la cellule. Souvent, il est accolé à la vacuole, mais il peut en être nettement séparé et, contrairement à ce que pensait Wager, il ne constitue pas avec elle un même organe. Il est quelquefois entouré de corpuscules métachromatiques

qui ont fait croire qu'il avait un contour irrégulier et qu'il était animé de mouvements amiboïdes (Moeller, Bouin). Peut-être même ces corpuscules peuvent-ils avoir envers le noyau un rôle nutritif.

La structure se rattache à deux types :

1° Une membrane très nette, un nucléohyaloplasme incolore, quelques éléments chromatiques disséminés dans le nucléohyaloplasme (*S. cerevisiæ*, *S. Pastorianus*, *S. ellipsoïdeus*);

2° Une structure analogue à celle que nous avons constatée chez les moisissures avec nucléohyaloplasme limité par une membrane et un chromoblaste (la plupart des levures et les Schizosaccharomycètes).

Il existe deux modes de division : dans le premier, le noyau s'allonge, pénètre dans le jeune bourgeon, et forme un rétrécissement médian où se produit la rupture ; dans quelques cas il s'allonge à peine, se divise sur place par un procédé à peu près semblable, et l'un des deux noyaux ainsi formés va rejoindre le bourgeon. Ce mode constitue donc un cas d'amitose typique. Le second procédé est celui que nous avons décrit chez les moisissures. Ces deux modes peuvent se rencontrer à la fois chez une même levure (*S. Ludwigii*). Cependant le second paraît plus fréquent chez certaines espèces, (*S. anomalus*, *S. membranæfaciens*,

S. mycoderma vini et *cerevisæ*). Enfin il est constant chez les Schizosaccharomycètes.

Dans quelques levures (*S. anomalus*) la position du noyau semble être quelquefois en rapport avec la naissance des bourgeons, mais ce fait peut être attribué à une simple coïncidence, et partout ailleurs les faits sont en désaccord avec les constatations d'Istwanfi.

Corpuscules métachromatiques. — Ces corpuscules, qui correspondent aux granulations chromatiques décrites par certains auteurs (Raum, Eisenschitz, Curtis, Wager), sont presque toujours localisés dans l'intérieur des vacuoles. On peut en rencontrer cependant dans le protoplasme et ils paraissent tous être d'origine protoplasmique. Ils présentent des formes extrêmement variables : ils sont ordinairement très petits à leur début ; ce n'est qu'au cours du développement qu'ils s'accroissent, se fusionnent et constituent de grosses sphérulés. La variabilité de leur forme et les situations diverses qu'ils occupent, soit dans le plasme, soit dans les vacuoles, a fait distinguer à Wager deux catégories de granules : 1° des grains de chromatine localisés dans la vacuole sous forme de très fines granulations ; 2° des grains de protéine ou d'huile placés dans le protoplasme et jouant le rôle de matières de réserve. Les colo-

rations à l'hémalun et au bleu de méthylène nous ont permis de les identifier. Ils sont généralement très nombreux dans les levures, cependant quelques-unes en possèdent peu (*Sch. octosporus*).

Ces corps, qui ont comme caractère essentiel de se colorer en rouge par un certain nombre de colorants (hématoxyline, bleu de méthylène, etc.), se montrent constitués par une paroi fortement colorée et une partie centrale plus pâle ; la couleur rouge est plus accentuée au centre.

Contrairement à Kunstler et Busquet, nous croyons pouvoir affirmer que cette métachromasie n'est point due à des phénomènes de diffraction, mais à une véritable coloration.

Les corpuscules métachromatiques sont surtout abondants lorsque les levures sont en pleine activité ; ils pénètrent dans les bourgeons avec les vacuoles et diminuent, au contraire, à la fin du développement ; à certains moments, ils paraissent se dissoudre et imprégner les cellules d'une substance qui se colore uniformément en rouge.

Nous n'avons pas pu nous renseigner sur leur nature chimique, mais cependant ils ne semblent point rentrer dans la catégorie des grains de protéine.

Ces corpuscules, communs à beaucoup de

microorganismes (protozoaires, algues, Bactériacées), paraissent très répandus chez les champignons, et il semble qu'on doive les considérer comme des produits de réserve au même titre que le glycogène.

Formes levures. — Nous avons observé, chez des levures de champignons mal déterminés (*M. candida*, *E. albicans*, *T. nigra*) et chez des conidies levures d'Ustilaginées, une structure absolument analogue avec un seul noyau par cellule. Les formes levures présentent donc aussi bien morphologiquement qu'histologiquement une remarquable conformité avec les Saccharomyces.

Sporulation. — La sporulation débute par une vacuolisation du protoplasme qui prend une structure alvéolaire, ressemblant beaucoup à celle qu'a décrite Bütschli chez les Cyanophycées. Les corpuscules métachromatiques et le glycogène, très abondants, sont répartis dans des vacuoles distinctes. Les premières occupent d'ordinaire le centre de la cellule et sont toujours en intime contact avec le noyau.

On remarque toujours un peu avant la division nucléaire d'étranges phénomènes qui ne peuvent s'expliquer que par une dissolution des corpuscules métachromatiques dans l'inté-

rieur des vacuoles : ceux-ci diminuent de nombre et de taille et le contenu des vacuoles prend une couleur uniformément rouge avec toutes les matières colorantes qui donnent aux corpuscules métachromatiques leur teinte spécifique.

La division du noyau est difficile à suivre. Cependant on peut s'en faire une idée assez précise, lorsqu'elle se produit d'un pôle à l'autre de la cellule (*S. Ludwigii*). Le noyau se divise en deux portions plus ou moins régulières, entourées d'une gaine de protoplasme ; le protoplasme se partage ensuite en deux masses, qui vont se placer aux deux extrémités de la cellule, entraînant chacune un noyau ; elles sont souvent reliées l'une à l'autre par un mince filet plasmique (fuseau achromatique de certains auteurs) qui, dans certains cas, présente un peu l'aspect d'un fuseau achromatique. La deuxième division se fait aux deux extrémités. Les deux nouveaux noyaux restent très rapprochés l'un de l'autre, et les spores se délimitent aussitôt par une sorte de membrane plasmique partant du noyau et restant ouverte à son extrémité opposée, ce qui donne aux ébauches de spores une forme de calotte. Peut-être pourrait-on rapprocher ce fait des phénomènes décrits par Harper chez certains Ascomycètes. La spore s'enveloppe ensuite d'une zone claire

qui paraît être l'origine de l'enveloppe cellulosique.

Il ne semble pas qu'on puisse se prononcer sur la division nucléaire qui a été mal interprétée par certains auteurs. Buscalioni, Janssens et Leblanc, Wager, en effet, semblent avoir confondu le plasme sporogène et le noyau et les avoir pris pour des figures karyokinétiques.

Les autres levures présentent des divisions analogues; elles se produisent ordinairement au centre de la cellule, ou en des points indéterminés, mais toujours très rapprochés les uns des autres, ce qui rend le phénomène encore plus difficile à observer.

Les spores, très petites d'abord, se développent peu à peu aux dépens de l'épiplasme. Celui-ci se désorganise et se transforme en un liquide cellulaire contenant en dissolution la substance des corpuscules métachromatiques et du glycogène; il est absorbé en presque totalité. Une fois mûres, elles se montrent formées d'un très petit noyau accolé à la membrane, d'où part un certain nombre de fines radiations protoplasmiques qui délimitent autant de petites vacuoles remplies de glycogène. Le protoplasme renferme un certain nombre de corpuscules métachromatiques.

La sporulation s'effectue d'une manière un peu différente chez les *Schizosaccharomyces*.

Au début du phénomène, le protoplasme se vacuolise, comme partout ailleurs, mais on ne rencontre jamais de glycogène. En revanche les spores sont imprégnées d'amyloïde.

La division du noyau s'accomplit comme dans le développement végétatif par un partage du chromoblaste en deux portions égales. Le *Sch. octosporus* nous offre un des types les plus favorables à l'étude de ce phénomène.

Les spores ne paraissent pas naître de la même façon que dans les autres levures : les noyaux s'entourent simplement d'une zone de plasme très dense qui s'arrondit et se délimite immédiatement.

Germination des spores. — La germination des spores ne présente pas d'intérêt spécial, la division nucléaire s'y accomplit suivant les procédés habituels.

Dans le *S. Ludwigii*, nous n'avons trouvé dans aucune circonstance les fusions entre deux spores qu'avait observées Hansen et il faut croire que ces phénomènes n'ont pas le caractère général que leur attribue cet auteur.

Phénomènes sexuels. — D'accord avec Wager, nous n'avons jamais constaté de division du noyau suivie d'une conjugaison, avant la

formation de l'asque, comme avaient cru l'observer Janssens et Leblanc, chez les *Saccharomyces*. On doit attribuer cette observation à une technique insuffisante. Les Saccharomyces que nous avons étudiés ne présentent donc aucune trace de sexualité.

Au contraire, nous avons découvert chez les Schizosaccharomyces des phénomènes de conjugaison que nous considérons comme constituant un des cas les plus typiques d'isogamie. Nous constatons cela chez les trois Schizosaccharomyces sporogènes (*Sch. octosporus*, *Sch. pombe*, *Sch. mellacei*).

Schiœnning avait déjà remarqué que la formation des asques du *Sch. octosporus* était précédée de la fusion de deux cellules sœurs restées accolées l'une à l'autre.

Nous avons vérifié et complété ces observations en suivant le développement d'une cellule de cette levure, sur gouttelettes pendantes, et nous avons constaté des phénomènes identiques chez les deux autres. Le développement s'accomplit de la façon suivante en partant de la germination des spores : les spores se gonflent, subissent un certain nombre de divisions, formant ainsi descolonies de cellules restant accolées les unes aux autres. De très bonne heure, on voit deux cellules contiguës, et issues très souvent

d'une même bipartition, former chacune un petit bec à l'une de leurs extrémités. Les deux becs s'allongent, se rejoignent et se soudent l'un à l'autre. La cloison séparatrice du canal de copulation se résorbe ; la cellule provenant de cette conjugaison prend une forme plus ou moins ovale et devient la cellule mère de l'asque. Il reste souvent dans la forme extérieure de l'asque des traces de l'individualité des deux cellules, surtout dans le *Sch. pombe* et le *Sch. mellacei.*

Ces phénomènes s'accompagnent toujours d'une fusion nucléaire : le noyau de chacun des gamètes s'introduit dans le canal de copulation et il se produit au milieu de ce canal une fusion des deux noyaux. Le noyau ainsi copulé ne tarde pas à se diviser pour se distribuer dans chaque spore.

C'est là en quoi consiste le phénomène d'une manière générale, mais il peut se produire un certain nombre d'anomalies. C'est ainsi qu'il peut exister des cas d'apogamie. D'autre part, dans les races sporogènes manifestant une tendance à devenir asporogènes, ainsi que dans certaines conditions défavorables à la production des spores, nous avons rencontré des essais de conjugaison n'aboutissant pas et donnant naissance à des formes bizarres.

Ce phénomène doit être considéré comme un

des plus beaux exemples de conjugaison par isogamie, au même titre que le Mesocarpus. Mais il possède un caractère plus primitif que partout ailleurs et c'est la première fois qu'on signale une conjugaison se produisant très souvent et d'une manière certaine entre deux cellules sœurs.

L'obscurité règne encore actuellement sur la question de la sexualité des Ascomycètes et si de nombreuses études ont apporté sur la question quelques faits précis, leur interprétation reste encore très discutée.

Eidam et Lagerheim ont signalé chez l'*Eremascus albus* et le *Dipodascus albidus* une conjugaison isogamique donnant naissance à l'asque. Mais ces observations n'ont pas été vérifiées.

Thaxter a montré chez les Laboulbéniacées que la formation de l'asque était toujours précédée d'une reproduction sexuelle par hétérogamie.

Dangeard a observé chez divers champignons une fusion de deux noyaux, se produisant dans la cellule mère de l'asque et de la baside et qu'il considère comme l'indice d'une sexualité rudimentaire. L'asque et la baside auraient donc la valeur d'un œuf. Mais si ces observations sont aujourd'hui indiscutables et ont été vérifiées par un certain nombre d'auteurs (Wager, Sappin-

Trouffy, Berlese, Rhuland, Maire), il n'en est pas moins vrai que Harper a décrit chez certains Ascomycètes, en dehors de ces mêmes phénomènes de fusion nucléaire, des cas de conjugaison hétérogamique avec anthéridie et oogone. Dangeard à cherché a donner une explication à ces faits, mais la question ne paraît pas être définitivement résolue.

Sans prendre part à la discussion, nous nous bornons à apporter des faits précis qui peut-être pourront constituer des renseignements utiles pour l'avenir.

L'ensemble de nos observations histologiques sur la sporulation nous a montré une relation évidente entre l'appareil de fructification des levures et les véritables asques, tant par la naissance des spores que par la constitution de l'épiplasme. Enfin nous avons remarqué une tendance dans certaines levures à la fixité du nombre des spores (*S. Ludwigi*, *Sch. octosporus*, *Sch. pombe*), et si la plupart des levures s'écartent des Ascomycètes par l'absence de fusion nucléaire dans la cellule mère de l'asque, au moins certaines d'entre elles s'en rapprochent-elles par de véritables phénomènes isogamiques : telles sont les trois espèces de Schizosaccharomyces que nous avons étudiées et le *Zygosaccharomyces* de Barker : cette isogamie est en réalité assez voisine de la fusion nucléaire

observée chez les Exoascées (1) ; elle n'en diffère que par l'existence d'une cloison individualisant les deux gamètes et on trouvera sans doute dans ces faits un argument en faveur de la signification sexuelle des phénomènes décrits par Dangeard. Nous avons montré d'autre part qu'il pouvait se présenter quelquefois chez les Schizosaccharomyces des phénomènes d'apogamie et que cela paraissait même être le cas général chez l'une des deux variétés du *Sch. mellacei.* Peut-être devrait-on considérer les levures ordinaires comme des formes ayant perdu toute trace de sexualité et ne se reproduisant plus que par parthénogénèse. Des exemples de ce genre se retrouvent fréquemment chez les algues.

Quoi qu'il en soit, ces observations ont un très haut intérêt ; si elles n'apportent que des faits rares, elles n'en sont pas moins instructives et nous renseignent sur la valeur de l'asque des levures que l'on doit considérer comme une

(1) Dans l'*Exoascus deformans*, d'après Dangeard, chaque cellule contient deux noyaux. Au moment de la sporulation, les deux noyaux se fusionnent. La cellule mère de l'asque ne contient donc qu'un seul noyau. Si l'on considère la cellule binucléée de l'Exoascus comme représentant une association de deux cellules, ne manifestant leur individualité que par la présence de deux noyaux, la fusion de ces deux noyaux constitue un phénomène identique à celui que nous décrivons chez les Schizosaccharomyces.

forme supérieure de ces champignons, qui paraissent devoir être définitivement maintenus parmi les Ascomyeètes. Ainsi sembleraient closes les longues discussions débattues entre Brefeld, de Bary, Pasteur, Hansen, sur l'origine des levures et réveillées dans ces dernières années par de nouvelles observations de Jœrgensen (1).

(1) Un certain nombre d'auteurs ont repris la question dansces dernières années et ont prétendu que les levures n'étaient que des formes de végétation d'autres champignons (Julher, Jœrgensen, Sorel).

CONCLUSIONS

Nous avons donc nettement établi dans ce travail les caractères de structure d'un grand nombre de levures et de formes levures, dont quelques-unes n'avaient pas encore été étudiées à ce point de vue.

Cette étude a été faite comparativement à celle de moisissures plus grosses qui nous ont apporté plus de précision et qui nous ont montré une structure très voisine de celle des levures.

A. — Nous avons mis en évidence d'une manière indiscutable la présence *d'un noyau* possédant *une structure différenciée* et se rapprochant des noyaux des champignons supérieurs ; nous l'avons distingué de granules pris par Wager pour des grains de chromatine, que nous avons assimilés aux *corpuscules métachro-*

matiques de Babès et aux *grains rouges de Bütschli.*

B. — Nous avons étudié de très près des caractères de ces corps si communs chez les microorganismes ; nous avons montré qu'ils étaient capables à certains stades de subir des *phénomènes de dissolution* et qu'ils paraissaient se comporter toujours comme des *produits de réserve.*

Nous avons apporté par là quelque clarté sur ces corps si diversement considérés et qui ont été l'objet de tant de travaux contradictoires. Si nous n'avons pu obtenir quelques renseignements sur leur nature chimique, au moins avons-nous indiqué un champignon qui présentait par la grande abondance de ces corpuscules une certaine facilité pour cette étude et qui permettra peut-être d'en trouver la solution par une analyse macrochimique.

C. — Avec l'étude de la sporulation nous avons constaté un certain nombre *de rapprochements entre les levures et les Ascomycètes supérieurs.*

D. — Enfin nous avons introduit définitivement une notion toute nouvelle chez les levures en découvrant des *phénomènes de sexualité* chez

trois espèces de Schizosaccharomyces et nous avons donné par là quelques renseignements précis sur la question très controversée de la sexualité des Ascomycètes.

A tous ces points de vue, la connaissance des levures présentait de nombreuses lacunes ; il paraissait utile de les combler.

15 février 1902.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

ALBERT. (R. et W.). — Phénomènes chimiques dans la cellule de levure morte, *Centr. f. Bakt. u. Parasitenk*, Bd VII, 1901.

ASCOLI. — Zur Morphologie der Bakterien und ihre Beziehungen zur Virulens, *Dtsch. med. Wochenschr.*, 1901.

BABES. — Ueber isolirt farbbare Antheile der Bakterien, *Zeitsch. f. Hyg.*, 1889.

— Beobacht. über die metachromatischen Kœrpechen, *Zeitsch. f. Hygiene*, 1895.

BARKER. — A fragrant « Mycoderma », Yeast S. Anomalus, *Ann. of Bot.*, 1900.

— A conjugating « Yast », *Proceedings of the Royal Society*, 9 juillet 1901.

— Sexual spore, formation among the Saccharomycetes, *Ann. of Bot.*, 1901.

BERLÈSE. — Studi citologici sui fonghi, *Riv. patol. vegetal*, VII.

— Il Cladochytrium violæ (fusion probable des noyaux dans l'oogone), *Riv. patol. vegetal*, VII.

BEYERINCK. — Schiz. octosporus, *Centr. f. Bakt. u. Parasitenk*, vol. XVI, 1894, p. 49.

Beyerinck. — Ueber Regeneration der Sporenbildung bei Alkoholhefen, *Centr. f. Bakt. u. Parasitenk*, 2e partie, t. III et IV.

— Die Laktase, *Centr. of Bakt. u. Parasitenk*, t VI, 1889.

Biffen. — A Fat Destroying Fungus, *Ann. of Botany*, vol. XIII, décembre 1899.

Bouin. — Contribution à l'étude du noyau des levures, *Archiv. d'anat. microscopique*, t. I, 1897.

Bolles Lee et Henneguy. — Traité des méthodes de technique d'anatomie microscopique, O. Doin, 1896.

Brefeld. — Bot. Untersuchungen ueber Schimmelpilze. Leipzig.

— Untersuchungen aus dem Gesammtgebiete der Mykologie, Munster, IX Heft, 1891.

Brücke. — Die Element organismen. *Sitzungsberichte der Kais. Akad. d. Vissenschaften zu Wien*, XLIV.

Bunge. — Ueber Sporenbildung bei Bakterien, *Fortsch. d. méd.* 1895.

Buscalioni. — Saccharomyces guttulatus, Rob. *Malpighia*, *anno X*.

Busse. — *Centr. f. Bakt. u. Parasitenk*, t. CXLIX, 1896.

Bütschli. — Ueber die sogenannten Centralkœrper der Zelle und ihre Bedeutung. *Verhandl. d. Natur histor.*

— *Mediz. Vereins zu Heidelberg*, Neuefolge, Bd IV, Heft 5.

— Weitere Untersuchungen uber den Bau der Cyanophyceen und Bakterien, Leipzig, 1896.

— *Protozoa. Bd. I von Bronn. Klassen und Ordnung des riereschеs*, Leipzig-Heidelberg.

— Untersuch. üb. mikroskopiche Schaume und das Protoplasma. Leipzig, 1892.

Casagrandi. — Ueber Morph. der Blastomycètes. *Centr. f. Bakt. u. Parasitenk*, 2e partie, t. IV, 1898.

Clautriau. — Étude chimique du glycogène des champignons et des levures. *Mém. Ac. roy. Belg.* t. III, 1895.

CRATO. — Morphologische und mikrochemische Unters. ueber die Physoden. *Bot. Zeitung*, 1893.

— Ueber die Hansteen'schen Fucosankœrner, *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, Bd XI, 1893.

— Die Physode, *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, Bd X, Heft 6.

— Beitrag zur Kenntniss der Protoplasmastruktur, *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, Bd X, Heft 8.

— Beitræge zur Anatomie des Elementarorganismus, *Cohn's Beitrægezur Biol. der Pflansen*, Bd. VII, 1896.

CROUCH. — *Zeitsch. f. Hygiene*, 1895.

CURTIS. — Contrib. à l'étude de la saccharomycose humaine. *Ann. Institut Pasteur*, 1896.

DANGEARD. — Sur la structure histologique des levures et leur développement. *C. R. Ac. sc.*, 3 juillet 1893.

— La reproduction sexuelle des champignons supérieurs comparée à celle de l'Actinosphærium, *Bull. de la Soc. de mycologie*, t. XVII, 1901.

— *Le Botaniste*, 1894 à 1901.

DE BARY. — Vergleichende Morph. und Biol. der Pilze. Mycetozoen und Bakterien, Leipzig, 1884.

DEINEGA. — *Bot. Centr.* 1891.

DUCLAUX. — Traité de Microbiologie, t. I, Microb. générale; t. III, Fermentation alcoolique.

EIDAM — Zur Kenntniss der Entwickelung bei den Ascomyceten, *Beitrage zur Biologie der Pflansen*, vol. III, 1883.

— Basidiobolus eine neue der Entomophthoraceen, id., 1884.

EISENSCHITZ. — Beitræge zur Morphologie der Sprosspilze. Inaug. Dissert. des univ. Bern; Wien, 1895.

— Ueber die Granulierung der Hefenzellen, *Centralbl. f. Bakt. u. Paras.*, I Abth.

ERNST. — Ueber Kern und Sporenbildung d. Bakterien, *Zeitsch. f. Hygiene*, 1888.

— *Zeitsch. f. Hygiene*, 1889.

ERNST. — Structure des bactéries, *Centr. f. Bakt. u. Paras.*, 1902.

ERRERA. — S. le glygogène des Basidiomycetes, *Mém. Ac. roy. de Belgique*, t. XXXVII, 1885.

— Glycogène de la levûre de bière, *C. R. Ac. des sciences*, 20 juillet 1885.

— Réserves hydrocarb. des Champignons, *C. R. Ac. des sc.*, 3 août 1885.

— L'épiplasme des Ascomycètes et le glycogène des végétaux. Thèse de l'Université de Bruxelles, 1882. *Bull. de l'Univ. de Bruxelles*, 1900.

ERRERA et LAURENT. — Planches de physiologie, Pl. V, texte p. 17.

FEINBERG. — Ueber den Bau der Bakterien, Bd XXVII, 1900.

FISCH. — Ueber das Verhalten der Zellkerne in fusionnierenden Pilzellen, *Tagebl. d. 58 'Versamml. Deutsch. Naturf. u. Aerzte*, 1885.

— Ueber die Pilzgattung Ascomyces, *Bot. Zeitg.*, 1885.

FISCHER (A.). — Unters. über den Bau der Cyanophyceen und Bakterien, Jena, 1897.

— Fixierung, Farbung und Bau des Protoplasmas, Jena, 1899.

FISCHER (B.) et BREBECK. — Zur Morphologie, Biol. und Systematick der Kahmpike der M. Candida und der Soorerrgers, Jena, 1894.

GAUSS. — Corpuscules de Babes-Ernst et virulence des bactéries. *Centr. f. Bakt.* 1902.

GJURASIN. — Ueber die Kerntheilung in den Schlauchen von Peziza vesiculosa, *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, 1893.

GREG. — A contribution to the study of the product. of the aroma in rum, *Bull. of the Botanic Depart. in Jamaica*, t. II, 1895 et t. III, 1896.

GRIFFON. — Revue des travaux de physiologie et de chimie, *Rev. génér. de bot.*, 1901.

GUÉGEN. — Recherches sur les organ. mycéliens des solutions pharmaceutiques, *Bull. de la Soc. mycol. de France*, 1899.

GUILLIERMOND. — Étude sur le développement et la structure de l'Oïdium lactis, *Rev. génér. de bot.*, 15 octobre 1900.

— Recherches histologiques sur quelques champignons inférieurs, *C. R. Ac. sc.*, 21 janvier 1901.

— Recherches histologiques sur la sporulation des levures, *C. R. Ac. sc.*, 13 mai 1901.

— Recherches sur la sporulation des Schizosaccharomyces, *C. R. Ac. sc.*, 22 juillet 1901.

— Considérations sur la sexualité de certaines levures, *C. R. Ac. sc.*, 23 octobre 1901.

HANSEN. — *Comptes rendus des travaux du laboratoire de Carlsberg*, Copenhague, 1887 à 1901.

— Die Schleinflusse lebender beobachteten Mikroorg. *Bot. Zeitg.*, Bd IV, 1889.

— Ueber die neuen Versuche das Genus Saccharomyces streichen, *Centr. f. Bakt.*, XIII Bd, 1893.

HARPER. — Beitrage Zur Kenntniss der Kernteilung und Sporenbildung im Ascus, *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, 1895.

— Die Entwickelung Peritheciums bei Spherotheca Castagnei, 1896.

— Ueber das Verhalten der Kerne bei ber Fruchtentwickelung einiger Ascomyceten, *Jahrb. fur viss. Botanik*, Bd XXIX, Heft 4, 1896.

— Division in Sporangia and Asci, *Ann. of Botan.*, vol. XIII, décembre 1899.

— Sexual Reproduction in Pyronema confluens and the Morph. of the Ascocarp., *Ann. of Botan.*, vol. XIV, 1900.

HARTOG. — Recherches sur la structure des Saprolégniées, *C. R. Ac. sc.*, 1889, t. CVIII.

— The cytology of Saprolegnia, *Trans. Irish. Ac.*, XXX, 1895.

HEGLER. — Untersuchungen über die Organisation der Phycochromaceenzelle, *Prinsgh. Jahrh. f. viss. Bot.*, 1901.

HENNEGUY. — Leçons sur la cellule, Paris, 1896.
HERTWIG (R.). — Kerntheil. Richtungskorperbild. und Befruchtung von Actinosphærium, *Abh. K. Bayer Akad. Viss.*, XIX, 2.
HIERONYMUS. — Ueber die Organisation der Hefenzellen, *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, 1893.
— Beitræge zur Morphologie und Biologie der Algen, *Cohn's Beitræge z. Biol. d. Pflansen.* Bd LIV, p. 461.
HINZE. — Ueber den Bau der Zellen von Beggiatoa mirabilis, *Cohn, Ber. der deut. bot. Ges.*, Heft 6, 1901.
HOFFMEISTER. — Zum Nachweise des Zellkernes bei Saccharomyces, *Sitzungsber. d. naturw. des Meddels. fra. Carlsb. Lab.*, iv. I, 1895.
HOLZE. — Oïdium Ludwigii, *Centr. f. Bakt. u. Parasit.*, 1901.
HUEPPE. — Methoden der Bakterienforschung, *Fortsch. der Medecin*, V, 1891.
— Die formen der Bakterien, *id.*, 1886.
ISTWANFI. — Ueber die Rolle der Zellkerne bei der Entwickelung der Pilze, *Ber. d.d. bot. Ges.*, 1895.
JANSSENS. — Beitræge z. der Frage über den Kern der Hefezelle, *Centr. f. Bakt. u. Parasit.*, Bd XIII. 1893.
JANSSENS et LEBLANC. — Recherches cytologiques sur la cellule de Levure, *la Cellule*, t. XIV, 1er fascicule.
JŒRGENSEN. — Der Ursprung der Weinhefen, *Centr. f. Bak.*, 2e Abt. 1895.
— Ueber der Alkolhefen, *Ber. d. gærungsphys. Lab. von Jörgensen*, Copenhague, 1895.
— *Centr. f. Bakt.*, 1896.
— Les microorganismes de la fermentation, trad. franç., 1894, 2e édit., 1899.
JUHLER. — Ueber die Umbildung des Aspergillus oryzæ in einen Saccharomyceten, *Centr. f. Bakt.*, 1e Abth., 1895.
KLEBS. — Die allgmeine Pathologie, 1887, t. I.

Klœcker et Schiœnning. — Que savons-nous de l'origine des Saccharomyces ? Résumé du *Compte rendu des travaux du laboratoire de Carlsberg*, vol. IV, fasc. 2, 1896.

Klœcker. — Recherches sur les S. Marxianus, apiculatus et anomalus, résumé du *C. R. des travaux du lab. de Carlsberg*. vol. IV, 1895.

Kosai et Jahn. — Ueber die bei Sakebereitung Beteiligten Pilze, *Centr. f. Bakt.*, 2e Abt., 1895.

Kossel. — Ueber das Nuclein der Hefe, *Zeitsch. f. physiol. Chemie*, Bd. III, p. 284.

Krasser. — Ueber das angebliche Vorkommen eines Zellkernes in den Hefezellen, *Oestr. bot. Zeitsch.*, 1885.

— Ueber den Zellkern der Hefe, *Oestr. bot. Zeitschrift*. 1893.

Krompecher. — Présence de granules métachromatiques dans les bactéries à spores. *Centr. f. Bak.*, 1901.

Kunstler. — Remarques sur certains points de l'histoire de la vie des organismes inférieurs, *C. R. Ac. sc.*, 1900.

Kunstler et Busquet. — Recherches sur les grains rouges, *C. R. Ac. sc.*, décembre 1897.

— Sur la morphologie du Cryptococcus guttulatus (Robin), *C. R. Ac. sc.*, 1890.

— Sur la valeur nucléaire du corps central des Bactéries, *C. R. Ac. sc.*, 1897, XXV, p. 112.

Lagerheim. — Le Dipodascus albidus, *Pringsheim Jahr. f. viss. Botanik*, Bd XXIV, Heft 4.

Laurent. — *Ann. de l'Institut Pasteur*, t. III, 1890, p. 115.

— Observations sur le champignon du Muguet, *Annales belges de microscopie*, t. XVI.

Lauterborn. — Ueber Bau und Kernteilung der Diatomeen, *Verhandl. D. naturhist. med. Vereins zu Heidelberg*, Bd V, Heft 2, 1893.

— Untersuchungen über Bau, Kernteilung und Bewegung der Diatomeen, Leipzig, 1896.

Laveran. — Sur un procédé de coloration des noyaux des Hématozoaires endoglobulaires des oiseaux, *C. R. Soc. biologie*, 15 avril 1899.

Léger (M.). — Recherches sur la structure des Mucorinées. Thèse de la Fac. des sciences de Paris, 1895.

Lindner. — Schiz. pombe, *Wochenschr. f. Brauerei*, 10e année, 1893, p. 1298.

— Ueberrothund schwartz gefarbte Sprosspile, *Wochenschr. f. Brauerei*, 1887, n° 44.

— *Centr. f. Bakter.*, t. II, 1896.

Macallum. — On the distribution of assimilated iron compound other than hemoglobin and hematin in animal and vegetal cell, *Quaterly J. of mic. sc.*, vol. XXXVIII.

Maffuci et Sirleo. — Osserv. ed experim. intorno ad un Saccaromicete patogeno, *Policlinico*.

— Beobachtungen bei Einschluss desselben in die Zellen der pathologischen Gewebe, *Vorlaüfige Mittheilung. Centr. f. Path. und path. Anatomie*, Bd VI, n° 8.

Maire (R.). — Note sur le développement saprophytique et sur la structure cytol. des sporidies levures chez l'U. maydis, *Bull. de la Soc. mycol. de France*, 1898.

— L'évolution nucléaire chez les Urédinées, *Bull. de la Soc. mycol. de France*, t. XVII, 1901.

— Recherches cytologiques sur les Hyménomycètes, *C. R. Ac. sc.*, 9 juillet 1900 et 1er avril 1901.

— Recherches cytologiques sur les Gastromycètes, *C. R. Ac. sc.*, 24 décembre 1900.

Marx (Fr.). — Untersuchungen über die Zellen der Oscillarien, Inaug. Diss. Erlangen Schwelm, 1892.

Marx (H.). et Woithe. — Ein Verfahren zur Virulensbestimmung der Bakterien, *Arbisten aus der kgl. chirurg. Klinik.*, Berlin, Bd XV, 1901.

— *Centr. f. Bakt.*, 1901.

Matruchot. — Revue des travaux sur les champignons. *Rev. génér. de bot.*, 15 novembre 1900.

MATRUCHOT. — Sur une structure particulière du protoplasme chez une Mucorinée, *Revue générale de botanique*, 13 février 1900.

MATRUCHOT et MOLLIARD. — *C. R. Ac. sc.*, décembre 1900.

— Variation de structure sous l'influence du milieu du Stichococcus bacillaris.

MASSART. — Recherches sur les organismes inférieurs et sur le protoplasme des Schizophytes, Bruxelles, 1901.

MEYER. — Ueber Kerne und Sporenbildung der Bacterien (*Flora*, p. 428, 1899).

MITTROPHANOW. — Études sur l'organisation des bactéries, *Journ. internat. d'anat. et de physiol.*, 1893, t. X.

MŒLLER. — Ueber den Zellkern und d. Sporen de Hefen, *Centr. f. Bak.*, 1892.

— Neue Untersuchungen über den Zellkern und d. Sporen d. Hefe, *Ber. d. deutsch. bot. Gesellsch.* 1893,

— Weitere Mittheilungen über den Zellkern und die Sporen der Hefe, *Centr. f. Bakt.*, 1893.

NADSON. — Ueber den Bau des Cyanophyceen Protoplastes, *Scripta botanica*, 1895, t. IV.

NÆGELI. — Zellenbildung und Zellenwachsthum bei Pflanzen. *Zeitsch. f. wiss. Bot.*, I Bd.

NAKANISCHI. — Ueber den Bau der Bakterien. *Centr. f. Bakt.*, 1901.

NEISSER. — *Deutsch med. Wochensch.*, n° 21, 1884, *Zeitsch. f. Hygiene*, 1897.

OLTMANNS. — La sexualité des champignons, *Biol. Centr.* 15 juillet 1901.

PALLA. — Beitræge zur Kenntniss der Baues des Cyanophyceen Protoplasts, *Pringsheims Jahrb. f. wis. Botanik*, Bd XXV, 1893.

— Ueber ein neues organ der Konjugatenzelle, *Ber. d. D. Ges*, Bd XII, 1894.

POIRAULT. — *Année biol.* de Délage, 1898.

PROTOPOPOFF. — Sur la structure des bactéries, *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1890.

RACIBORSKI. — Ueber die Inhalskœrper der Myriophyllum-trichome; *Ber. d. d. bot. Ges.*, Bd XIII, 1895.

RAUM. — Zur Morph. und Biol. d. Sprosspilze, *Zeitschr. f. Hygiene*, Bd X, 1891.

RHULAND. — Zur Kenntniss der intracellularen Karyogamie bei Basidiomyceten, *Bot. Zeitung*, Heft 10, 1901.

RONCALI. — Sur des parasites particuliers trouvés dans un adénocarcinome de l'ovaire, *Ann. de micrographie*, VII, 1895.

— *Centr. f. Bak.*, t. XVIII, 1895; t. XX, 1896; t. XXIV, 1898.

ROUX et LINOSSIER. — Recherches morph. sur le champignon du Muguet, *Archives de médecine expérimentale*, 1890.

— La fermentation alcoolique et la transformation de l'alcool en aldhéhyde provoquée par le champignon du Muguet, *Bull. de la Soc. de chimie de Paris*, 1890.

SANFELICE. — Contrib. à la morph. des Blastomycètes, *Ann. de micrographie* et *Ann. Ist. Igien. Univ. Roma.*

SAPPIN-TROUFFY. — Recherches histologiques sur les Urédinées. Thèse de doctorat de la Faculté des sciences de Paris.

SCHEWIAKOFF. — Ueber einen bakterienæhnlichen organismus der Süswassers, *Habilit. Schr. v. Verhandl. d. Naturhist. medizin-Vereins zu Heidelberg*, 1893, Bd III.

SCHLEIDEN. — Grimdzüge der Botanik.

SCHIŒNNING. — Nouvelle et singulière formation d'ascus dans une levure, *C. R. des travaux du lab. de Carslsb.*, 4e vol. 1er liv., 1895.

SCHILLING. — Anatomisch. Biologisch Untersuchungen über die Schleimbildungen der Wasserpflanzen, in *Flora*, 1894, p. 346.

Schmitz. — Ueber die Zellkerne der Tallophyten, *Verhandl d. Naturhist. Vereins d. preuss Rheinlande u. Wesfalens*, 1880.

Seiter. — Studien über die Abstammumg der Saccharomyceten, *Bayer Brauer Journal*, IV, 1896.

Sjœbring. — Ueber Kerne und Teilungen bei den Bakterien, *Centr. f. Bak.*, 1892.

Sorel. — Étude sur l'Asp. oryzæ, *C. R. Ac. sc.*, t. LXXI, 1894, p. 948.

Steinhaus. — Die Ætiologie der acuten Eitergungen, Leipzig, 1889.

Stokmayer. — Ueber Spaltalgen, *Ber. d. d. bot. Ges.*, 1894.

Strasburger. — Bot. Praticum, 2e Aufl.

Thaxter. — Contr. towards a monograph of the Laboulbeniacæ, *Mem. of the american Academy*, v. XII, nº 3, 1896.

Tokishige. — Ueber pathogene Blastomycetur. *Centr. f. Bak.*, t. XIX, 1896.

Trambusti et Galeotti. — Neuer Beitrag zum Studium der inneren Struktur der Bakterien, *Centr. f. Bak.*, 1892, Bd II.

Trow. — The Karyology of Saprolegnia, *Ann. of Botany*.

Van Tieghem. — Traité général de botanique, 2e édition, p. 1132.

Van Tieghem et Le Monnier. — Rech. sur les Mucorinées, *Ann. des sc. nat. Bot.*, 5e série, t. XVII, 1873.

— Nouvelles recherches sur les Mucorinées, *Ann. des Sc. nat. Bot.*, 6e série, t. I, 1875.

Vialleton. — Précis de technique hist., Collection Testut, O. Doin.

Vjedoski. — *Centr. f. Bak.*, 1901.

Vlad Rusika. — Zur Frage von der inneren Structur des Microorganism. *Centr. f. Bak.*, 1re partie, t. XXIII, 1898.

VUILLEMIN. — Études biologiques sur les champignons, *Bull. de la Soc. des sc. de Nancy*, 1886.
— Le champignon du Muguet, *C. R. Ac. sc.*, 1898.
— Les formes du champignon du Muguet, *Revue mycologique*, 1899.
— Les Blastomycètes pathogènes, *Revue générale des sciences*, juillet 1901.
WAGER. — On the nucleus of the Hymenomycetes, *Ann. of Botany*, 1892.
— On the nuclear division in the Hymenomycetes, *Ann. of Botany*, 1893.
— *Annals of Botany*, 1897.
— The nucleus of the Yeast-Plant, *Ann. of Botany*, vol. XII, 1898.
— Report. Brit. Assoc., 1895 (Toronto). Compte rendu dans *Royal microsc. Society*, february 1898.
— The sexuality of Fungi, *Ann. of Bot.*, t. XIII, 1899.
WAGNER. — *Centr. f. Bakt. u. Paras.*, 1898, XXIII, p. 433-489.
WARLICH. — Bakteriologische Studien, *Scripta botanica*, St-Petersburg.
— Zur Frage über den Bau der Bakterienzelle, *Arb. d. St-Petersb. Naturf. Ges.*, 1891.
WEHMER. — Asp. oryzæ der Lilz der japanischen Saké-Brazerei, *Centr. f. Bakt.*, 2e Abt., 1895.
VILL. — Vergleichende Untersuchungen an vier untergærigen Arten von Bierhefe, *Centr. f. Bakt.*, Bd II, 1896.
— Bemerkungen zu der Mitteilung von Casagrandi ueber die Morphologie der Blastomycetes, *Centr. f. Bakt.*, 2e partie, IV.
ZACHARIAS. — Beitræge zur Kenntniss des Zellkerns und Sexualzellen, *Bot. Zeitung*, 45 Jahg.
— Ueber den Nucleolus, *Bot. Ztg.*, 1885.
— Ueber die Zellen der Cyanophyceen, *Bot. Ztg.*, 1890.
— Ueber die Zellen der Cyanophyceen, *id.*, 1892.

ZACHARIAS. — Ueber die Chemische Beschaffenheit des Zellkerns, *Bot. Ztg.*, 1881.
— Ueber den Zellkern, *id.*, 1882.
— Ueber Eiweiss Nuclein und Plastin, *id.*, 1883.
— Ueber die Chemische Beschaffenheit von Cytoplasma und Zellkern, *id.*, 1893.
ZALEWSKY. — Ueber Sporenbildung in Hefezellen, *Verhandl. der Krakauer Akad. der Viss. Math. naturw.*, sektion 1885, Bd XIII.
ZIEMANN. — *Centr. f. Bakt.*, t. XXIV, 1898.
ZIMMERMANN. — Die Morphologie und Physiologie der Pflanzenzellen rübingen.
— Die botanische Mikrotecknick-rübingen, 1892.
ZUKAL. — Ueber den Zellinhalt der Schizophyten, *Sitzungsb. d. k. Akad. d. w. in Wien.-Math. naturw. klasse*, 1892, Ad 102, Abt. 1.
— Zur Frage über den Zellinhalt der Cyanophyceen, *Ber. d. D. bot. Ges.*, 1894.
— Neue Beobactungen über Cyanophyceen, *ib.*

TABLE DES MATIÈRES

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

1° ZOOLOGIE. — DES FERMENTS DES LEVURES QUI ONT ÉTÉ RETROUVÉS CHEZ LES ANIMAUX.

2° GÉOLOGIE. — CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES TERRAINS JURASSIQUES DU BASSIN DU RHONE.

Vu et approuvé : Paris, le 16 mars 1902.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

G. DARBOUX.

Vu et permis d'imprimer.

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris.

GRÉARD.

Lyon. — Imp. A. Storck & Cie, 8, rue de la Méditerranée.

ERRATA

Page 17, ligne 14, au lieu de : Cette cellule, lisez : *Chaque cellule*

— 20 — 23, au lieu de : Eisenchitz, lisez : *Eisenschitz*

— 33 — 8, au lieu de : Meyer, lisez : *Mayer*

— 46 — 23, au lieu de : extrémité, terminale de la cellule, lisez : *extrémité terminale des filaments*

— 48 — 25, au lieu de : Strerig. matocystis, lisez : *Sterigmatocystis*

— 73 — 19, au lieu de : un à trois noyaux, lisez : *un à huit noyaux*

— 74 — 18, au lieu de : se cloisonner, lisez : *le cloisonnement*

— 81 — 24, au lieu de : Basidomycètes, lisez : *Basidiomycètes*

— 86 — 11, au lieu de : levures. Le glycogène ne pénétrant pas ou très peu dans les vacuoles à corpuscules métachromatiques, cette structure, lisez : *levures, le glycogène ne pénétrant pas ou très peu dans les vacuoles à corpuscules métachromatiques. Cette structure*

— 87 — 22, au lieu de : un peu réfringent, lisez : *peu réfringent*

— 104 — 10, au lieu de : une asque, lisez : *un asque*

— 104 — 12, au lieu de : Van Tieghen, lisez : *Van Tieghem*

— 108 — 8, au lieu de : celles, lisez : *celle*

— 110 — 21, supprimez : *noyau*

— 110 — 23, au lieu de : forme, lisez : *ferme*

— 115 — 16, au lieu de : qu'il joue, lisez : *qu'ils jouent*

— 118 — 16, au lieu de : ovales, lisez : *plus ovales*

— 137 — 8, au lieu de : méthyl, lisez : *méthyle*

— 152 — 25, au lieu de : elle offre, lisez : *méritent et plus loin elles offrent*

— 266 — 12, au lieu de : ce noyau, lisez : *du noyau*

— 259 — 7, au lieu de : une plus grande consistance et une moindre réfringence que les globules d'huile, lisez : *une moins grande consistance et une moindre réfringence que les corpuscules métachromatiques*

PLANCHE I

Dematium (species).

(Coloré à l'hématoxyline de Heidenhain de 1 à 26 et à l'hémalun de 27 à 30) (1).

Fig. 1. — Filament jeune ; noyaux avec leur structure ; quelques corpuscules métachromatiques non colorés se laissent apercevoir dans les vacuoles.

Fig. 2, 3 et 4. — Formation des conidies levures. La figure 3 montre des stades de division du noyau.

Fig. 5. — Oïdie.

Fig. 6 et 7. — Filaments jeunes.

Fig. 9. — Oïdie en voie de bourgeonnement.

Fig. 10 et 11. — Conidies levures germant. La fig. 11 montre un stade de division du noyau où l'on aperçoit nettement la persistance de la membrane.

Fig. 12. — Oïdie.

Fig. 13, 14 et 15. — Conidies levures.

Fig. 16. — Conidie levure germant ; stade de division du noyau avec persistance de la membrane.

Fig. 17 à 26. — Conidies levures.

Fig. 27 à 30. — Filament et conidies levures en voie de dégénérescence. Le protoplasme s'est transformé en globules d'huile colorés en brun par l'acide osmique et se présentant sous forme de masses allongées à contours un peu irréguliers. On distingue quelques corpuscules métachromatiques plus petits, colorés en rouge sombre par l'hémalun.

(1) Toutes les figures ont été dessinées à l'aide de l'objectif à immersion homogène 1/12 de Zeiss et l'oculaire compensateur numéro 6, et avec la chambre claire de Zeiss (grossissement : environ 1125).



A. Storck & Cie, édit. Al. Guilliermond, del.

Planche I

PLANCHE II

Oïdium lactis (de 1 à 19).

(Coloré à l'hématoxyline de Heidenhain, sauf 8 et 10 colorés au bleu de méthylène.)

Fig. 1. — Filament âgé; noyaux avec leur structure.

Fig. 2, 3, 6, 14, 15, 17, 18 et 19. — Oïdies en voie de germination; noyaux et stades de division des noyaux.

Fig. 9, 11 et 12. — Oïdies.

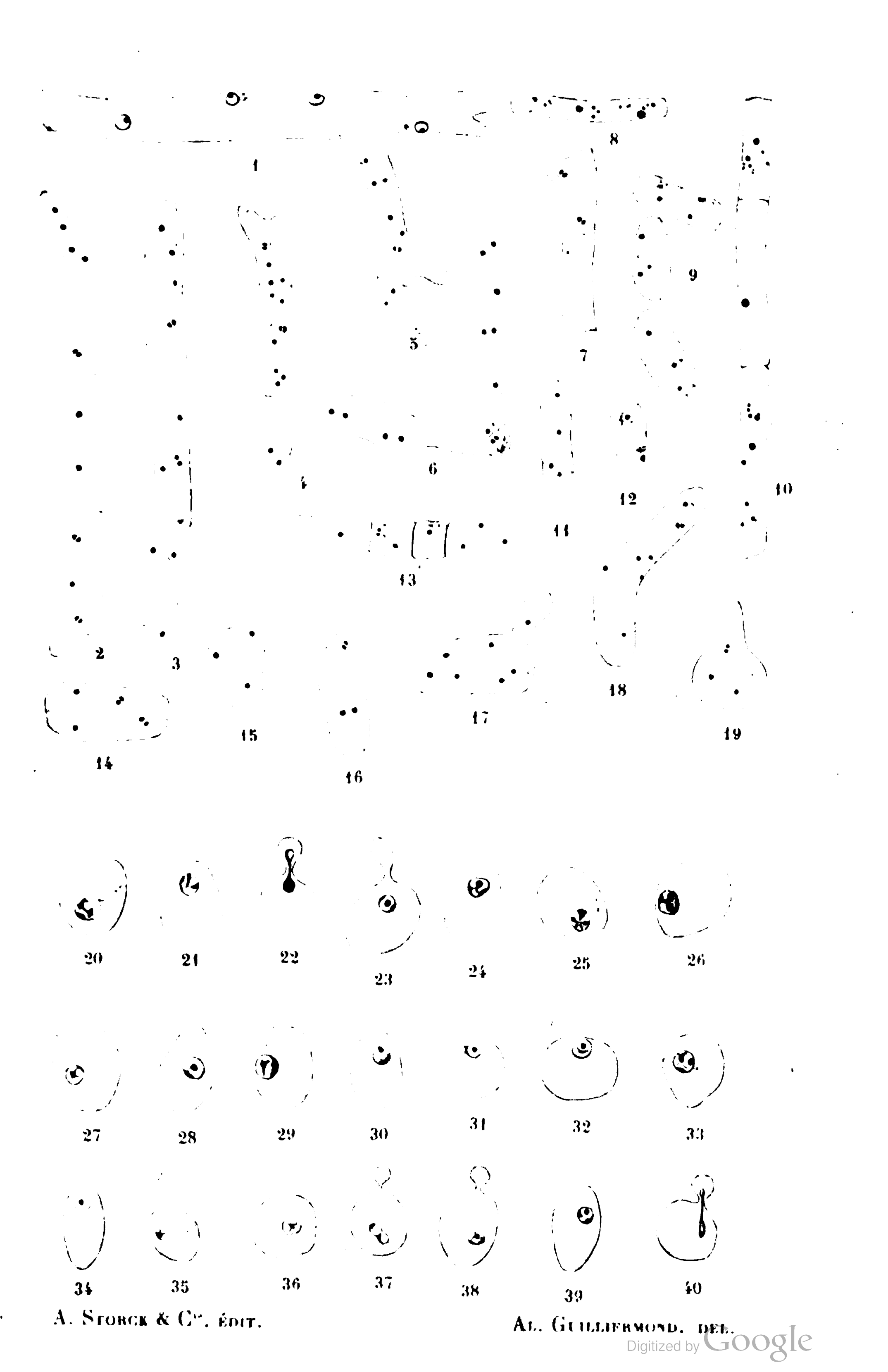
Fig. 4, 5 et 7. — Filaments en voie de croissance. Stades de division des noyaux.

Fig. 8 et 10. — Corpuscules métachromatiques localisés dans les vacuoles et fortement colorés. Les noyaux ne sont pas visibles.

Fig. 13. — Formation des oïdies.

Saccharomyces cerevisiæ (de 20 à 40).
(Coloré à l'hématoxyline de Heidenhain.)

Fig. de 20 à 40. — Cellules au début de la fermentation ; noyaux avec leur structure. 22, 37 et 40, stades de division du noyau.



A. Storck & Cie. édit. Al. Guilliermond, del.

Planche II

PLANCHE III

Saccharomyces cerevisiæ (suite) (de 1 à 41).

(Coloré à l'hématoxyline de Heidenhain.)

Fig. 1 à 15. — Cellules au début de la fermentation montrant leur noyau avec sa structure et sa division. — Dans la figure 7, le noyau est placé au-dessus de la vacuole et paraît être dans son intérieur.

Fig. 16 à 20. — Cellules après vingt-quatre heures de fermentation. Elles sont entièrement occupées par une vacuole glycogénique à teinte diffuse et contenant des granules faiblement colorés et de nature inconnue.

Fig. 21 à 30. — Division des noyaux et du plasme sporogène pendant la sporulation.

Fig. 31 à 34. — Formation des spores.

Fig. 35. — Asque constitué.

Fig. 36. — Asque contenant des spores gonflées et prêtes à germer.

Fig. 37 à 40. — Germination des spores.

Saccharomyces ellipsoïdeus (de 42 à 48).

(Coloré à l'hématoxyline de Heidenhain.)

Fig. 42 à 48. — Cellules au début de leur développement. Noyaux avec leur structure.

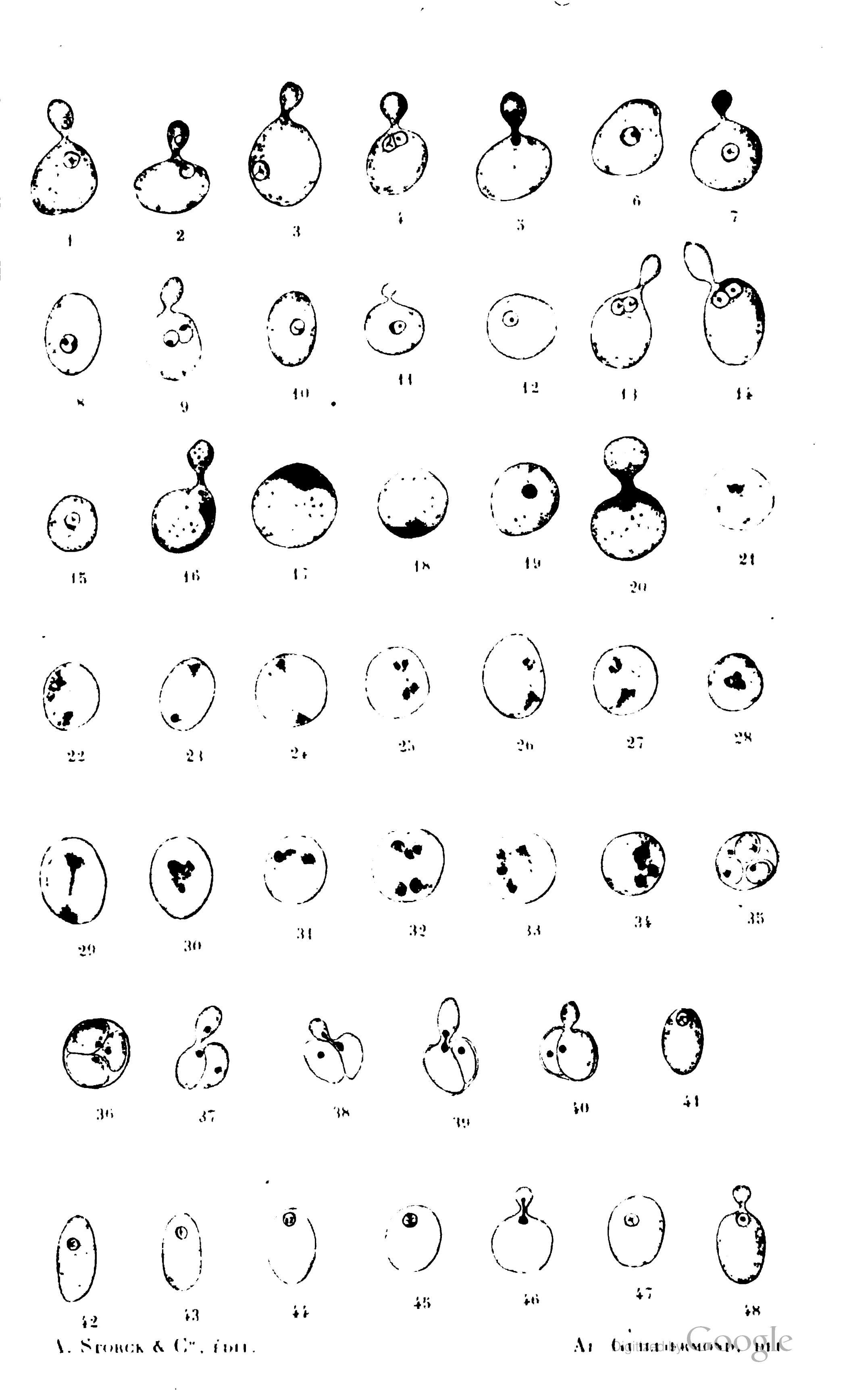

A. Storck & Cie, Édit.
A. Guilliermond, del.

PLANCHE IV

Saccharomyces ellipsoïdeus (de 1 à 8).
(Coloré à l'hématoxyline de Heidenhain.)

Fig. 1 à 3. — Cellules jeunes, noyaux avec leur structure.
Fig. 4 à 8. — Divisions du noyau et du plasme sporogène pendant la sporulation.

Saccharomyces Pastorianus (de 9 à 25).
(Figures colorées à l'hématoxyline de Heidenhain.)

Fig. 9 à 14. — Cellules jeunes montrant leur noyau avec sa structure.
Fig. 15 à 17. — Divisions du noyau et du plasme sporogène pendant la sporulation.
Fig. 18 à 20. — Formation des spores.
Fig. 22 à 25. — Germination des spores.

Saccharomyces subcutaneus tumefaciens (de 26 à 28).
(Coloré à l'hématoxyline de Heidenhain.)

Fig. 26, 27 et 28. — Cellules jeunes montrant un petit noyau homogène.

Saccharomyces anomalus (de 29 à 38).
(Coloré à l'hémalun de 29 à 35 et à l'hématoxyline de Heidenhain de 36 à 38.)

Fig. 29 à 31 et 34. — Cellules jeunes montrant leur noyau faiblement coloré et leurs vacuoles à corpuscules métachromatiques, ces derniers étant fortement colorés.
Fig. 32, 33 et 35. — Cellules montrant des vacuoles à corps métachromatiques et des vacuoles glycogéniques, celles-ci ayant une teinte diffuse.
Fig. 36 et 37. — Division du noyau pendant la sporulation.
Fig. 38. — Formation des spores.

Saccharomyces membranæfaciens (de 39 à 43).
(Coloré à l'hémalun de 39 à 41 et à l'hématoxyline de Heidenhain de 42 à 43.)

Fig. 39 à 41. — Cellules jeunes, noyaux et corpuscules métachromatiques.
Fig. 42. — Division du noyau pendant la sporulation.
Fig. 43. — Formation des spores.

Saccharomyces Ludwigii (de 44 à 50).
(Coloré à l'hématoxyline de Heidenhain.)

Fig. 44 à 47. — Cellules au début du développement montrant un noyau homogène et des stades de division du noyau.
Fig. 48 à 50. — Cellules au moment de la sporulation ; elles ont été peu decolorées par l'alun de fer et laissent apparaître une structure alvéolaire. 50 montre deux masses de plasme sporogène très colorées et placées aux deux pôles. Deux points paraissent plus fortement colorés que le reste, dans la masse de plasme sporogène située dans la partie supérieure et paraissent indiquer deux noyaux. On n'en distingue qu'un dans la masse inférieure.



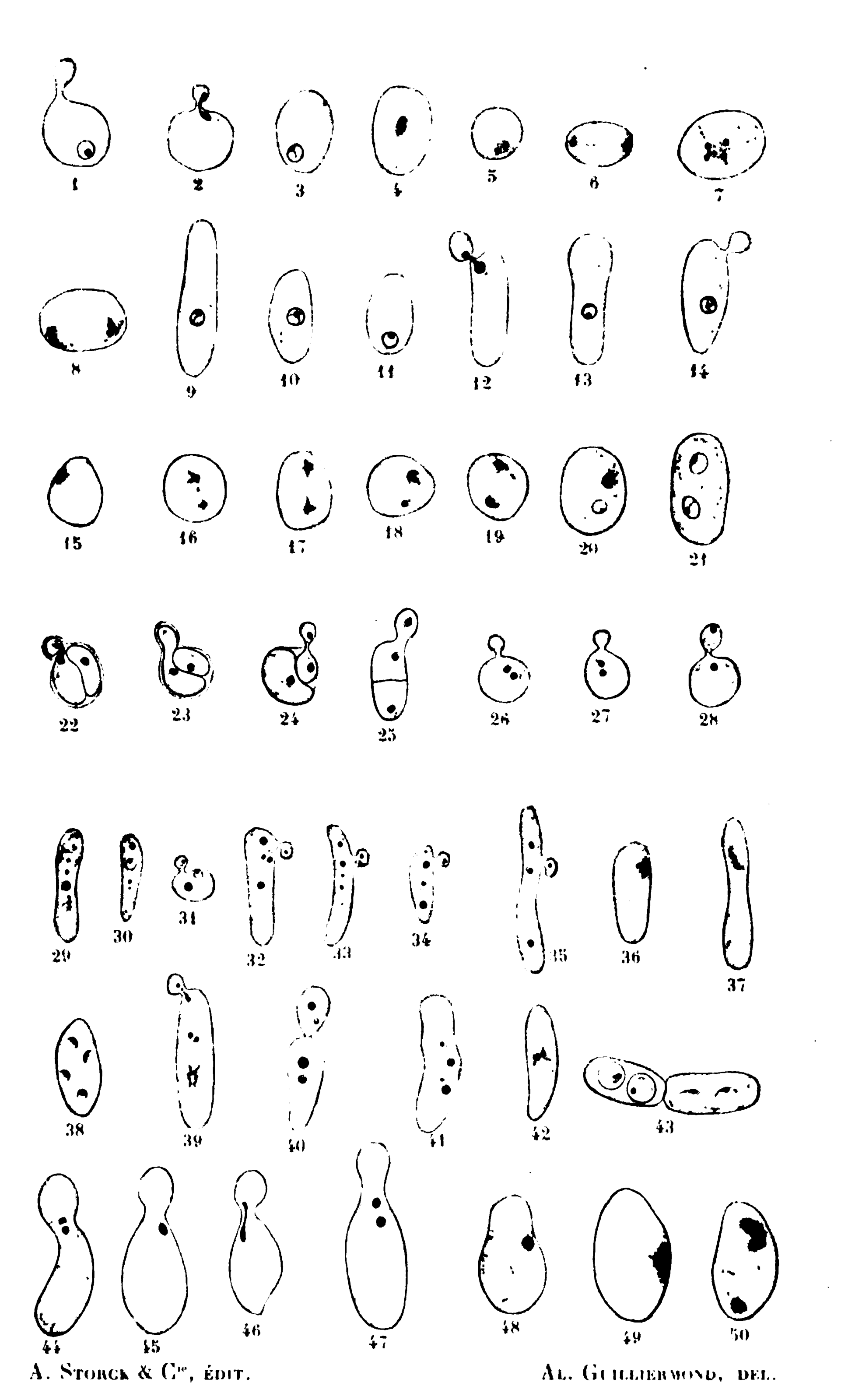

1 2 3 4 5 6 7
8 9 10 11 12 13 14
15 16 17 18 19 20 21
22 23 24 25 26 27 28
29 30 31 32 33 34 35 36 37
38 39 40 41 42 43
44 45 46 47 48 49 50
A. Storck & Cie, édit.
Al. Guilliermond, del.

Planche IV

PLANCHE V

Saccharomyces Ludwigii.

(Coloré à l'hématoxyline de Heidenhain, sauf les figures de 36 à 41 qui sont colorées à l'hémalun.)

Fig. de 1 à 6 et 8. — Stades de division du noyau et du plasme sporogène pendant la sporulation. Les cellules sont peu décolorées et les noyaux se confondent avec le plasme sporogène fortement coloré. On les distingue cependant dans quelques cellules comme des taches plus sombres.

Fig. 7, 9, 10, 11, 12, 13. — Formation des spores et leur délimitation par une zone sombre en demi-cercle (cellules peu décolorées).

Fig. 14 à 25, 27 à 30 et 33. — Divisions du noyau et du plasme sporogène pendant la sporulation. Les cellules très décolorées, le plasme sporogène est gris, le noyau noir foncé et le reste de la cellule est complètement décoloré. La fig. 28 montre des stades de division ressemblant un peu à une karyokinèse.

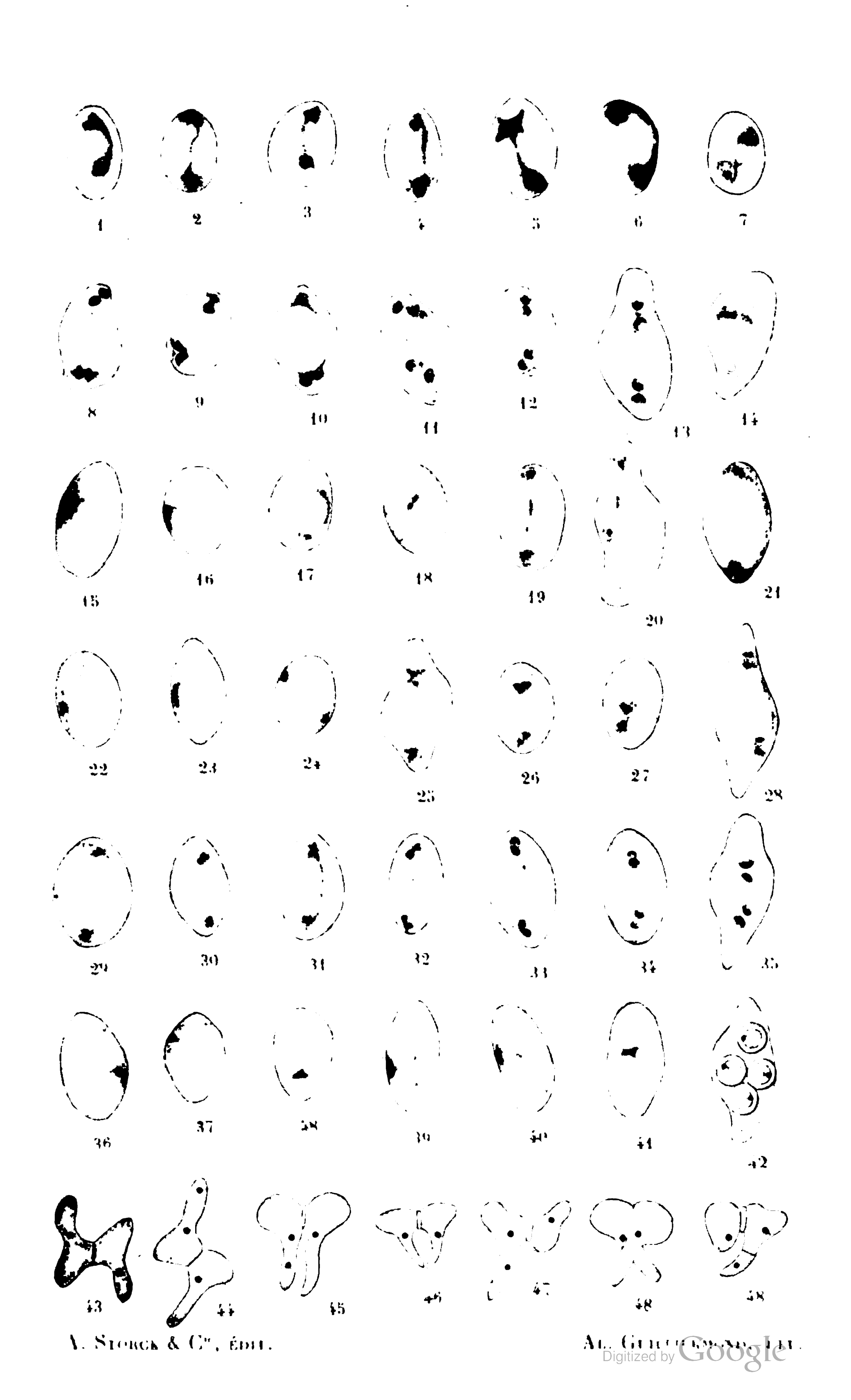
Fig. 26, 32, 34 et 35. — Formation des spores en forme de calotte.

Fig. 36, 37 et 39. — Cellules au début de la sporulation (la fixation ayant été faite par l'acide picrique, les corpuscules métachromatiques ne sont pas colorés). Le protoplasme montre une belle structure alvéolaire.

Fig. 38, 40 et 41. — Division du noyau pendant la sporulation.

Fig. 42. — Asque constitué.

Fig. 43 à 49. — Germination des spores.



A. Storck & Cie, Édit.

Al. Guillermond, Lit.

Planche V

PLANCHE VI

Schizosaccharomyces octosporus.

(Coloré à l'hématoxyline de Heidenhain.)

Fig. de 1 à 4. — Cellule au début du développement, noyau et division nucléaire.

Fig. 5 à 11. — Stades de fusion des deux gamètes. La cloison séparatrice persiste encore.

Fig. 12 à 16. — Stades de fusion des deux gamètes, dans lesquels la cloison séparatrice est résorbée. 12 à 15 représentent un stade de fusion du noyau ou la première division du noyau déjà fusionné (?).

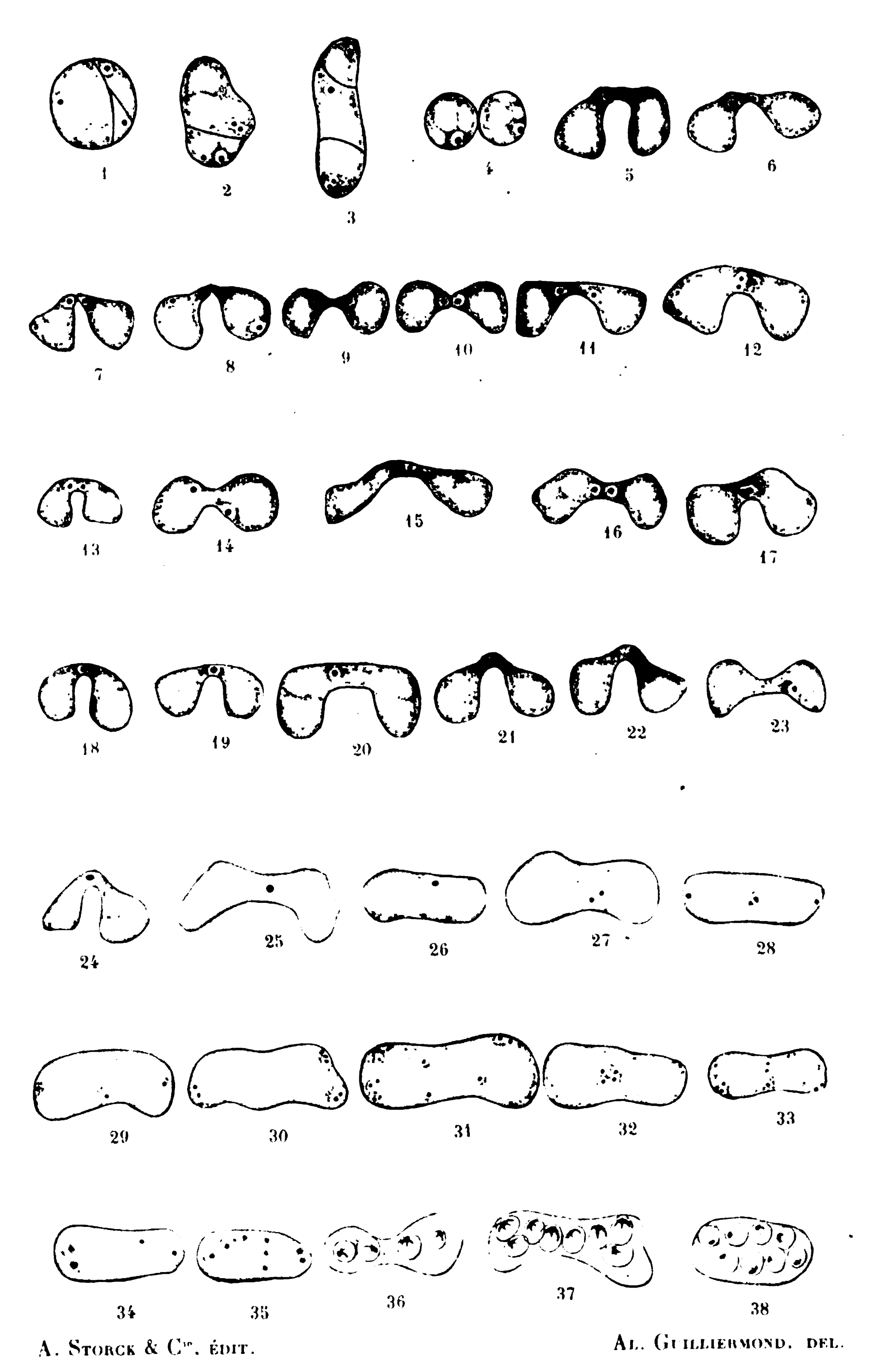
Fig. 17. — Stade de fusion nucléaire.

Fig. 18 à 26. — Cellules provenant de la fusion de deux gamètes et ne renfermant plus qu'un seul noyau, la fusion étant effectuée.

Fig. 27 à 33. — Stades de division nucléaire pendant la sporulation.

Fig. 34 et 35. — Formation des spores.

Fig. 36 à 38. — Asques constitués.



A. Storck & Cie, édit.

Al. Guilliermond, del.

Planche VI

PLANCHE VII

Schizosaccharomyces pombe (de 1 à 28).

(Coloré à l'hématoxyline de Heidenhain de 1 à 4, de 9 à 24 et au bleu de méthylène de 5 à 8 et de 25 à 27.)

Fig. 1 à 4. — Cellules au début du développement montrant leur noyau.

Fig. 6 à 8. — Id. Le noyau n'est pas coloré. On aperçoit les corpuscules métachromatiques fortement colorés et localisés dans les vacuoles.

Fig. 9 à 12. — Stades de fusion des deux gamètes. La cloison séparatrice persiste.

Fig. 13. — Id. La cloison a disparu. Les noyaux sont en voie de fusion ou subissent leur première division ?

Fig. 14 à 19. — Id. Les noyaux ont operé leur fusion.

Fig. 20 à 23. — Divisions nucléaires pendant la sporulation.

Fig. 24. — Asque constitué.

Fig. 25. — Cellule mère de l'asque avec ses corpuscules métachromatiques. Le noyau n'apparaît pas.

Fig. 26 et 27. — Asques constitués. Les spores n'ont pas fixé le bleu de méthylène et sont entourées de corpuscules métachromatiques en voie de dissolution.

Schizosaccharomyces mellacei (de 28 à 34).

(Coloré par l'hématoxyline de Heidenhain.)

Fig. 28 et 31. – Cellules végétatives.

Fig. 32 et 34. — Stades de fusion des deux gamètes et de division nuclaire.

Saccharomyces mycoderma cerevisiæ (de 35 à 47).

(Coloré à l'hématoxyline de Heidenhain de 35 à 44 et à l'hémalun de 45 à 47.)

Fig. 35 à 44. — Cellules jeunes montrant leur noyau et sa division.

Fig. 45 à 47. — Id. Le noyau apparaît avec une teinte pâle, les corpuscules métachromatiques sont fortement colorés.

Saccharomyces mycoderma vini (de 48 à 52)

(Coloré à l'hématoxyline de 48 à 50 et à l'hémalun de 51 à 52.)

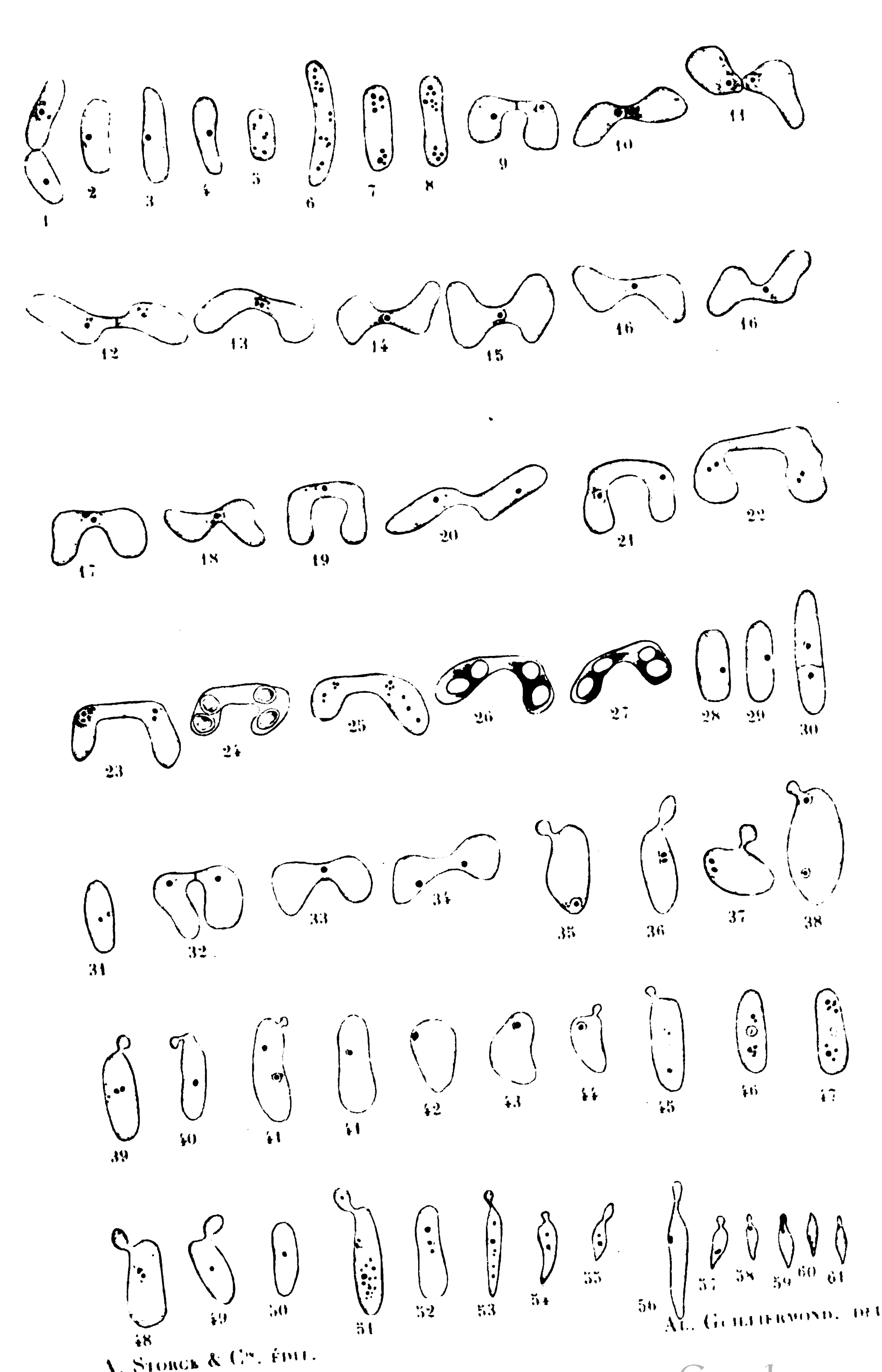
Fig. 48 à 50. — Cellules jeunes avec leur noyau.

Fig. 51 et 55. – Id. Noyaux et corpuscules métachromatiques.

Saccharomyces apiculatus (de 53 à 61).

Fig. 53 à 55. — Cellules jeunes colorées à l'hémalun, noyaux et corpuscules métachromatiques.

Fig. 56 à 61.— Id. colorées à l'hématoxyline de Heidenhain, noyaux.



A. Storck & Cie. Édit.

Al. Guilliermond. del.

Planche VII

PLANCHE VIII

Endomyces albicans (de 1 à 11).
(Coloré à l'hématoxyline de Heidenhain.)

Fig. 1 à 8. — Cellules jeunes cultivées sur carotte, noyaux et divisions nucléaires.

Fig. 9 et 19. — Cellules cultivées sur liquide Raulin, noyaux. La vacuole glycogénique occupe la plus grande partie des cellules. Dans les fig. 9 et 19 la décoloration a été poussée très loin et cette vacuole est incolore. Dans la fig. 11 moins décolorée, la vacuole a une teinte diffuse et on aperçoit quelques granules dans son intérieur.

Torula nigra (de 12 à 26).
(Coloré à l'hémalun de 12 à 32 et à l'hématoxyline de Heidenhain de 23 à 26.)

Fig. 12 à 21. — Formes levures, noyaux et corpuscules métachromatiques.

Fig. 22. — Forme mycélienne, noyaux et corpuscules métachromatiques.

Fig. 23 et 26. — Formes levures, noyaux.

Monilia candida (de 27 à 36).
(Coloré à l'hémalun.)

Fig. 27 à 35. — Cellules jeunes, noyaux et corpuscules métachromatiques.

Fig. 35 et 36. — Id. Apparition d'une vacuole glycogénique se distinguant de la vacuole à corpuscules métachromatiques par sa couleur diffuse.

Ustilago avenæ (de 37 à 47).
(Coloré à l'hématoxyline de Bœhmer de 37 à 46, au bleu de méthylène de 41 à 43 et à l'hématoxyline de Heidenhain de 44 à 47.)

Fig. 37 à 46. — Cellules montrant leur noyau et une structure alvéolaire. Les corpuscules métachromatiques ont été décolorés.

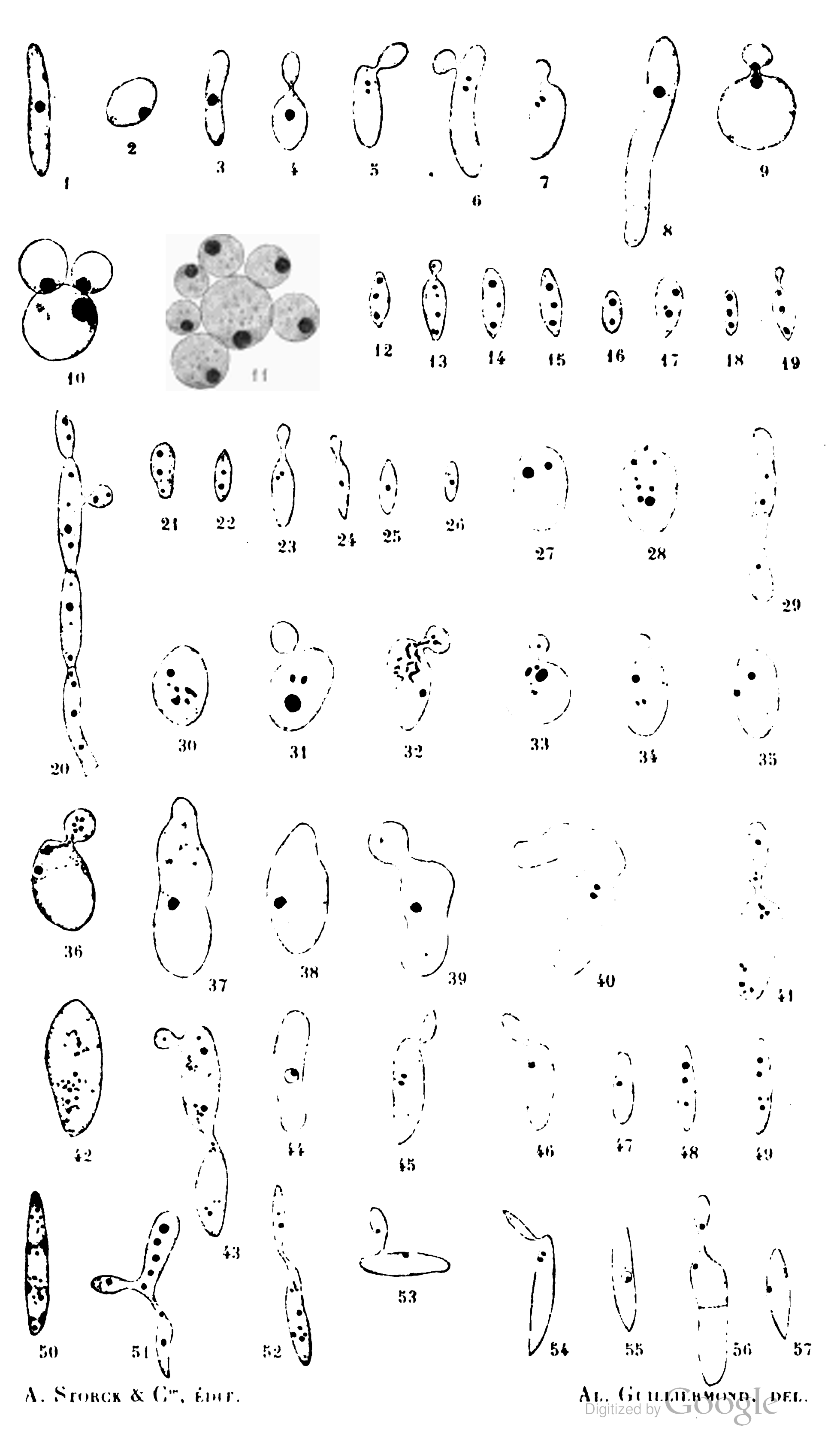
Fig. 41 à 43. — Structure alvéolaire dans laquelle on aperçoit des vacuoles à corpuscules métachromatiques et des vacuoles glycogéniques; ces dernières ayant une teinte diffuse.
Le noyau n'est pas coloré.

Fig. 44 à 47. — Cellules montrant leur noyau avec sa structure.

Ustilago maydis (de 48 à 57).
(Coloré à l'hémalun de 47 à 52 et à l'hématoxyline de Heidenhain de 52 à 57.)

Fig. 48 à 52. — Noyaux et corpuscules métachromatiques.

Fig. 52 à 57. — Noyaux.



A. Storck & Cie, Édit.

Al. Guilliermond, del.

Planche VIII

PLANCHE IX

Dematium (species).

(Coloré à l'hémalun de 1 à 11, au bleu polychrome de 12 à 16 et au bleu de méthylène de 17 à 25) (1).

Fig. 1 à 5. — Filaments jeunes montrant leurs noyaux teints en bleu mat et les corpuscules métachromatiques en rouge intense. La fig. 3 montre une division du noyau.

Fig. 6. — Conidies germant; corpuscules métachromatiques et noyaux.

Fig. 7 à 11. — Conidies levures; corpuscules métachromatiques et noyaux. Dans la fig. 10 on aperçoit des stades de division nucléaire.

Fig. 12. — Formation des conidies levures; pénétration de la vacuole et des corpuscules métachromatiques dans les bourgeons.

Fig. 13. - Filament jeune; corpuscules métachromatiques.

Fig. 14, 15 et 16. — Filaments plus âgés; corpuscules métachromatiques ayant atteint leur dimension maxima.

Fig. 17, 18, 22, 23, 25. — Corpuscules métachromatiques teints en bleu foncé montrant un centre en rouge pâle.

Fig. 19 à 21. — Corpuscules métachromatiques colorés en bleu foncé.

(1) Par suite de la nécessité du tirage, les colorations rouges des corpuscules métachromatiques ont été schématisées. Dans la réalité, elles sont d'un rouge plus sombre avec l'hémalun et plus violet avec le bleu de méthylène. Les nuances que nous représentons sont conformes à celles qu'on obtient à l'aide du bleu polychrome.



319-

PLANCHE X

Saccharomyces cerevisiæ.

(Coloré par l'hémalun de 1 à 30 et par le bleu de méthylène de 31 à 49.)

Fig. 1 à 27. — Cellules au début du développement.

Le noyau est bleu mat et ne laisse voir aucun détail de structure; les corpuscules métachromatiques sont en rouge intense.

Les figures 1 à 14, 23 et 27 montrent tous les stades du bourgeonnement (division de la vacuole et du noyau).

Fig. 28 à 30. — Cellules envahies par la vacuole glycogénique ; celle-ci prend une teinte diffuse et montre dans son intérieur quelques granules faiblement colorés.

Fig. 31 à 37. — Cellules au début du développement. Vacuoles à corpuscules métachromatiques.

Fig. 38 à 41. — Cellules après vingt-quatre heures de développement. Apparition des vacuoles glycogéniques à droite et à gauche de la cellule, ou d'un seul côté. Elles ont une teinte diffuse et se distinguent difficilement du protoplasme.

Fig. 42 à 46. — Les vacuoles glycogéniques se sont fusionnées en une seule qui occupe toute la cellule. Les vacuoles à corpuscules métachromatiques disparaissent peu à peu et les corpuscules sont refoulés avec le protoplasme à la périphérie des vacuoles.

Fig. 47 et 48. — Cellules prises au moment où la fermentation se ralentit. Disparition de la vacuole glycogénique et réapparition des vacuoles à corpuscules métachromatiques.

Fig. 49. — Cellules à la fin de la fermentation.

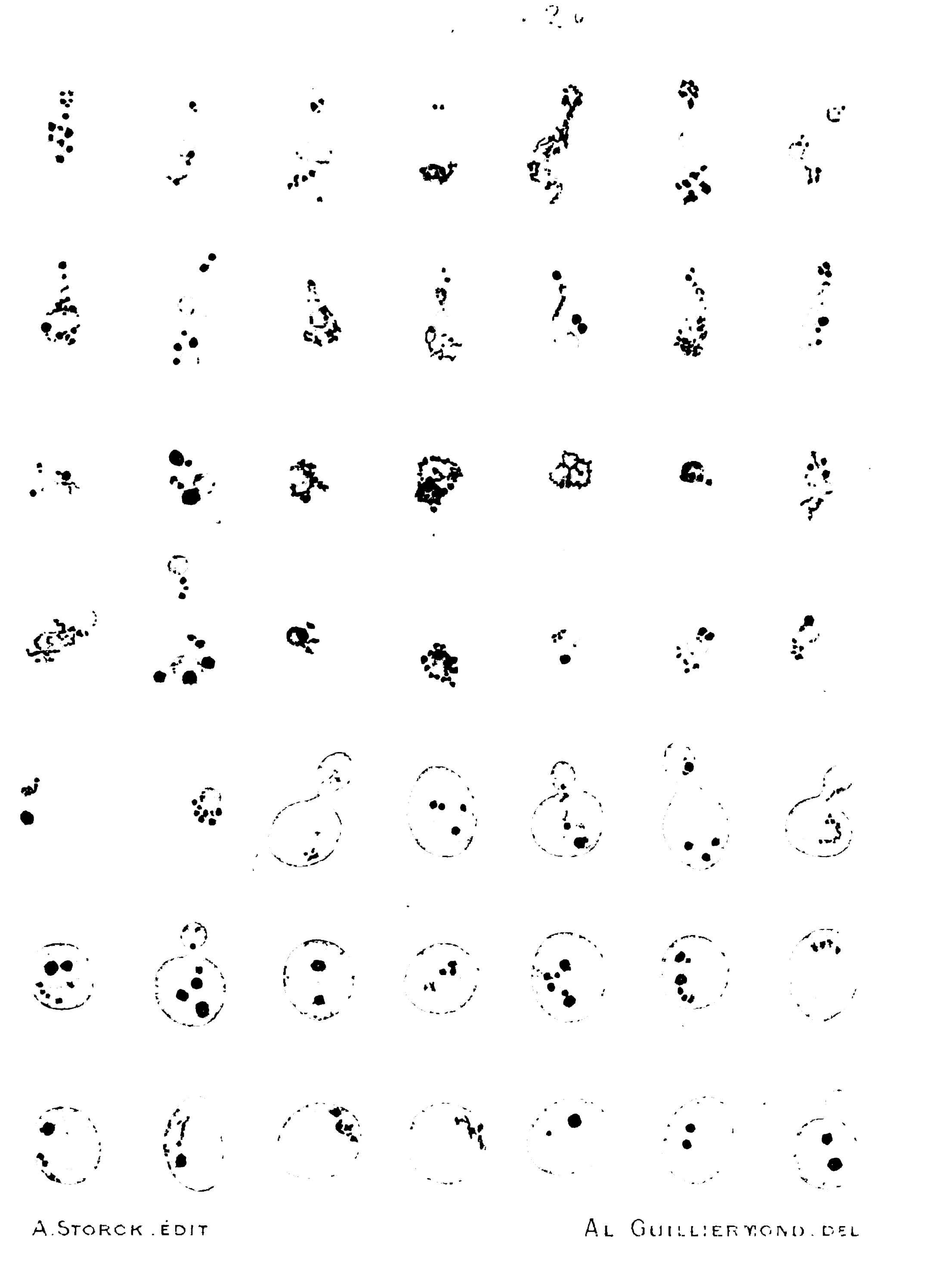


Planche X.

PLANCHE XI

Saccharomyces Pastorianus (de 3 à 6).
(Coloré à l'hémalun.)

Fig. 1 et 2. — Cellules au début du développement.

Fig. 3 à 6. — Cellules se préparant à sporuler.
On remarque une vacuole glycogénique aux deux pôles. Au centre est placée une vacuole à corpuscule métachromatique qui commence à se diviser pour donner lieu à une structure alvéolaire.

Saccharomyces kefir (de 7 à 11).
(Coloré à l'hémalun.)

Fig. de 7 à 11. — Cellules jeunes, noyaux et corpuscules métachromatiques.

Saccharomyces Ludwigii (de 12 à 47).
(Coloré à l'hémalun de 12 à 14, au bleu polychrome de 15 à 21, au vert de méthyle et à l'iodo-iodure de Gram de 22 à 23, et au bleu de méthylène de 24 à 47.)

Fig. 12 à 14. — Cellules au début de la fermentation, noyaux et corpuscules métachromatiques

Fig. 15. — Idem. Corpuscules métachromatiques. Le noyau ne s'aperçoit pas.

Fig. 16. — Idem. Structure alvéolaire.

Fig. 17 à 21. — Cellules au milieu de la fermentation. Vacuoles à corpuscules métachromatiques et vacuoles glycogéniques.

Fig. 22 et 23. — Idem. Les corpuscules métachromatiques sont brun foncé, le glycogène est coloré en brun acajou.

Fig. 24. — Cellules se préparant à sporuler, à structure vacuolaire et renfermant une grande abondance de corpuscules métachromatiques.

Fig. 25 à 37. — Stades de la dissolution des corpuscules métachromatiques, précédant la sporulation. Les vacuoles à glycogène sont mal délimitées et ont une teinte diffuse; les vacuoles à corpuscules métachromatiques sont uniformément colorées en rouge pâle.

Fig. 38 à 41. — Idem. Le noyau s'aperçoit avec une teinte bleue plus foncée que le protoplasme.

Fig. 42 et 43. — Idem. Condensation du plasme sporogène autour du noyau.

Fig. 44 à 47. — Division du noyau pendant la sporulation.

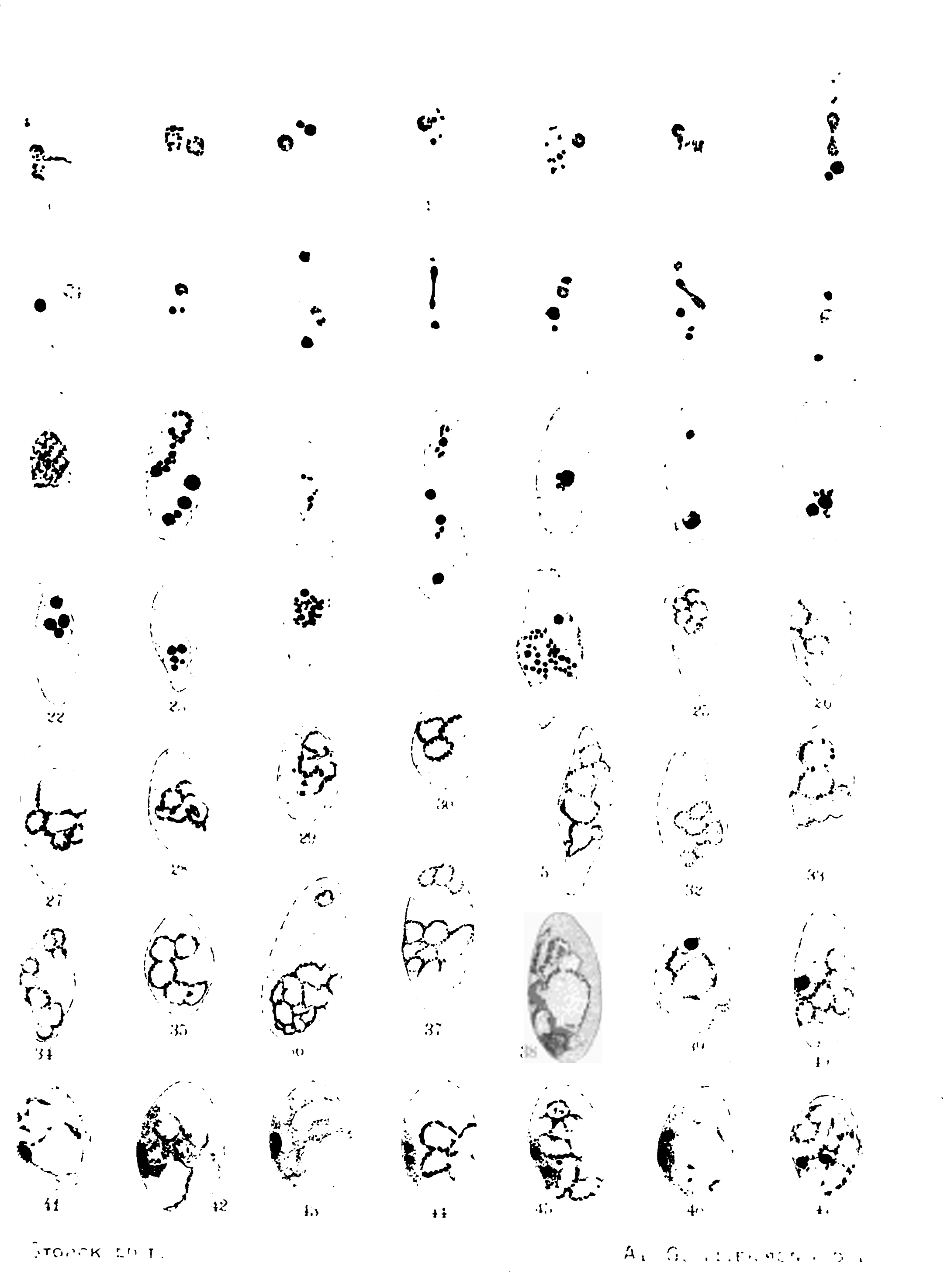


Planche XI

PLANCHE XII

Saccharomyces Ludwigii (de 1 à 25).

(Coloré par le bleu de méthylène de 1 à 21, par l'iodo-iodure de potassium de 22 à 25.)

Fig. 1 à 4. — Division du noyau et du plasme sporogène pendant la sporulation.

Fig. 5 à 7. — Formation des spores.

Fig. de 8 à 21. — Absorption progressive du liquide, provenant de la dissolution des corpuscules métachromatiques et du reste de ces corpuscules non dissous, par les spores.

Fig. 22 à 25. — Absorption progressive du glycogène par les spores.

Saccharomyces cerevisiae (de 26 à 28).

(Coloré au bleu de méthylène.)

Fig. de 26 à 28. — Stades de dissolution des corpuscules métachromatiques et leur absorption aux dépens des spores.

Saccharomyces Pastorianus (de 29 à 38).

(Coloré au bleu de méthylène.)

Fig. 29 à 33. — Dissolution des corpuscules métachromatiques, précédant la sporulation.

Fig. 34 à 38. — Absorption de ces corpuscules aux dépens des spores.

Saccharomyces ellipsoïdeus (de 39 à 43).

(Coloré au bleu de méthylène.)

Fig. 39 et 40. — Dissolution des corpuscules métachromatiques, précédant la sporulation.

Fig. 41. — Formation des spores. Elles sont entourées d'une zône hyaline.

Fig. 42 et 43. — Absorption des corpuscules métachromatiques par les spores.

Saccharomyces membranaefaciens (de 44 à 46).

(Coloré au bleu de méthylène.)

Fig. 44. — Dissolution des corpuscules métachromatiques précédant la sporulation.

Fig. 45 et 46. — Leur absorption par les spores.

Saccharomyces anomalus.

(Coloré par le bleu de méthylène.)

Fig. 47 et 48. — Dissolution des corpuscules métachromatiques, précédant la sporulation.

Fig. 49. — Leur absorption par les spores.

PLANCHE XII

Saccharomyces Ludwigii (de 1 à 25).

(Coloré par le bleu de méthylène de 1 à 21, par l'iodo-iodure de potassium de 22 à 25.)

Fig. 1 à 4. — Division du noyau et du plasme sporogène pendant la sporulation.

Fig. 5 à 7. — Formation des spores.

Fig. de 8 à 21. — Absorption progressive du liquide, provenant de la dissolution des corpuscules métachromatiques et du reste de ces corpuscules non dissous, par les spores.

Fig. 22 à 25. — Absorption progressive du glycogène par les spores.

Saccharomyces cerevisiæ (de 26 à 28).

(Coloré au bleu de méthylène.)

Fig. de 26 à 28. — Stades de dissolution des corpuscules métachromatiques et leur absorption aux dépens des spores.

Saccharomyces Pastorianus (de 29 à 38).

(Coloré au bleu de méthylène.)

Fig. 29 à 33. — Dissolution des corpuscules métachromatiques, précédant la sporulation.

Fig. 34 à 38. — Absorption de ces corpuscules aux dépens des spores.

Saccharomyces ellipsoïdeus (de 39 à 43).

(Coloré au bleu de méthylène.)

Fig. 39 et 40. — Dissolution des corpuscules métachromatiques, précédant la sporulation.

Fig. 41. — Formation des spores. Elles sont entourées d'une zône hyaline.

Fig. 42 et 43. — Absorption des corpuscules métachromatiques par les spores.

Saccharomyces membranæfaciens (de 44 à 46).

(Coloré au bleu de méthylène.)

Fig. 43. — Dissolution des corpuscules métachromatiques précédant la sporulation.

Fig. 45 et 46. — Leur absorption par les spores.

Saccharomyces anomalus.

(Coloré par le bleu de méthylène.)

Fig. 47 et 48. — Dissolution des corpuscules métachromatiques, précédant la sporulation.

Fig. 49. — Leur absorption par les spores.

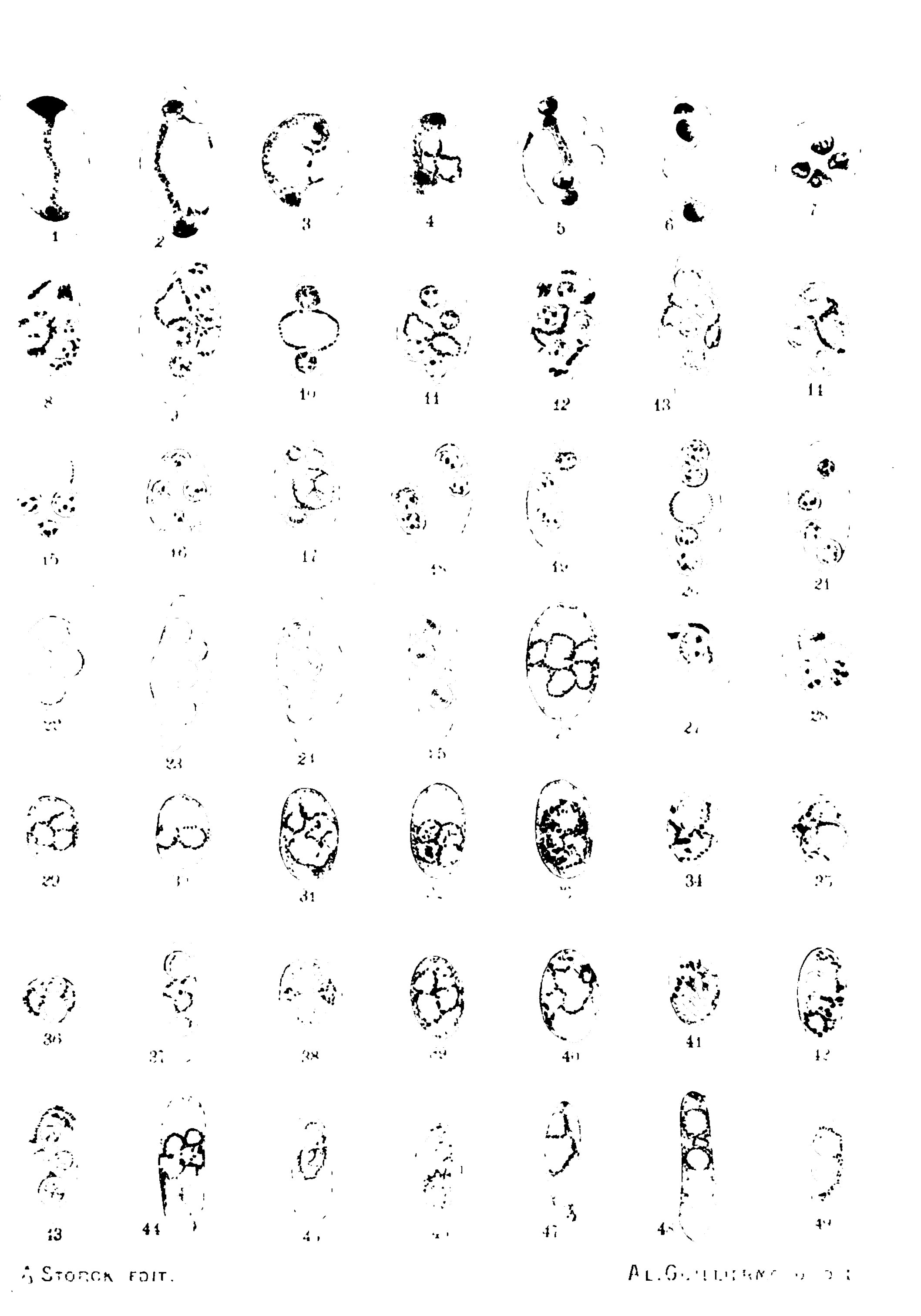


Planche XII.

